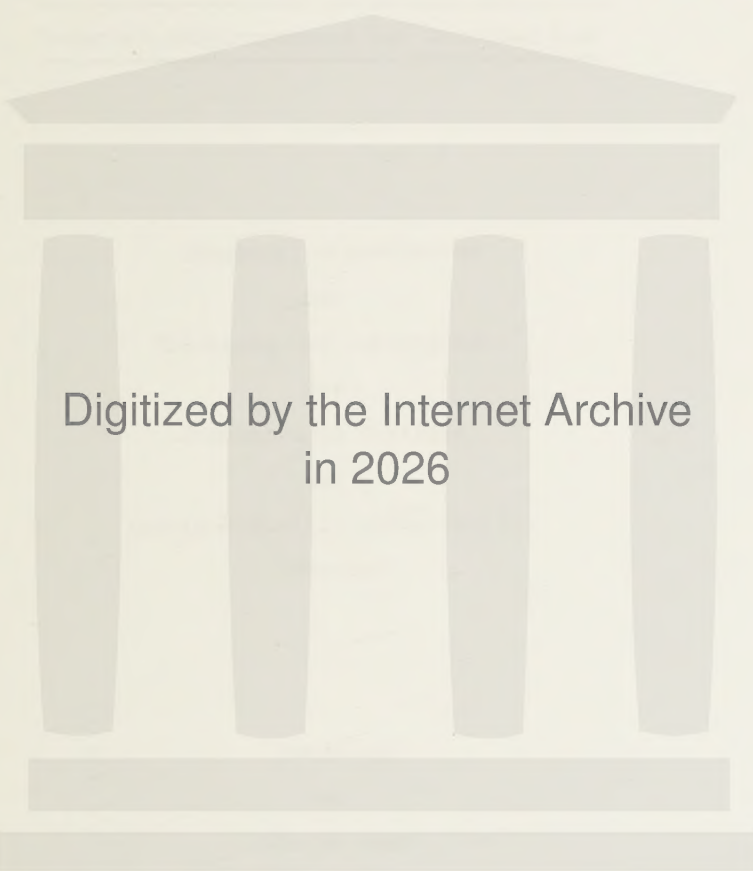


**Untersuchung der kinetischen Eigenschaften und
der Quartärstruktur von
allosterischen L-Lactat-Dehydrogenasen
bei Lactobacillen**

Ulrich Mayr

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0026

Untersuchung der kinetischen Eigenschaften
und der Quartärstruktur von allosterischen
L-Lactat-Dehydrogenasen bei Lactobacillen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Ulrich Mayr
aus
Bad Reichenhall
September 1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der Einreichung der Arbeit: 21. 9.1977
Tag der Annahme der Arbeit: 7.11.1977
Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.1977

Inhaltsverzeichnis

Seite:

TEIL I

Reinigung der L-LDH von <i>L.curvatus</i> und <i>L.casei</i> und Charakterisierung der katalytischen Eigen- schaften.....	1
1. EINLEITUNG.....	1
2. ERGEBNISSE.....	5
2.1 Enzymreinigung.....	5
2.2 Stabilität der Enzyme.....	8
2.2.1 Dialyse.....	8
2.2.2 Verdünnung.....	9
2.2.3 Hitzestabilität.....	10
2.3 Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität....	12
2.4 Spezifität der Metallionen-Bedürftigkeit...	14
2.5 Die katalytische Aktivität der L-LDH-asen mit Lactat als Substrat.....	16
2.6 Sättigungsverhalten gegenüber Substrat, Coenzym und Effektoren.....	16
2.6.1 Pyruvat-Sättigung der <i>L.curvatus</i> und <i>L.casei</i> L-LDH.....	19
2.6.2 Pyruvat-Sättigung der <i>L.casei</i> L-LDH in Ge- genwart der Substratanalogen α -Keto- butyrat und Oxamat.....	23
2.6.3 Abhängigkeit der Umsatzrate von der Mn^{2+} - Konzentration.....	25
2.6.4 Abhängigkeit der Umsatzrate von der FDP- Konzentration.....	26
2.6.5 Abhängigkeit der Umsatzrate von der NADH- Konzentration.....	27
3. DISKUSSION.....	29

TEIL II

Versuche zur Quartärstruktur.....	32
1. EINLEITUNG.....	32
2. ERGEBNISSE.....	37
2.1 Einfluß des pH-Wertes und der Effektoren auf die Sedimentationskonstante und das Moleku- largewicht der L-LDH von <i>L.curvatus</i> und <i>L.casei</i>	37
2.2 Denaturierung und Renaturierung der L-LDH- asen von <i>L.curvatus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.acidophilus</i> und <i>L.plantarum</i>	43
2.3 Reaktionsordnung der Reaktivierung der L-LDH von <i>L.curvatus</i> und <i>L.casei</i>	45
2.3.1 Nach basischer Denaturierung.....	45
2.3.2 Nach Harnstoffdenaturierung.....	47
2.3.3 Einfluß von NADH auf die Reaktivierungsge- schwindigkeit der <i>L.curvatus</i> und <i>L.casei</i> L-LDH nach Harnstoffdenaturierung.....	51
2.4 Hybridisierungsversuche zwischen den L-LDH- asen von <i>L.curvatus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.plantarum</i> und <i>L.acidophilus</i>	52
2.4.1 Hybridisierung der L-LDH-asen von <i>L.curvatus</i> und <i>L.casei</i>	52
2.4.2 Hybridisierung der L-LDH-asen von: <i>L.curvatus</i> - <i>L.acidophilus</i> ; <i>L.casei</i> - <i>L.plantarum</i>	57
2.5 Stabilität der <i>L.curvatus</i> - <i>L.casei</i> homo- und heteromeren L-LDH-Formen.....	57
2.6 Einfluß verschiedener Hybridisierungsmethoden auf die Mengenverteilung der <i>L.curvatus</i> - <i>L.casei</i> homo- und heteromeren L-LDH-Formen....	59
2.7 Hybridisierungsversuche zur Aufklärung der Quartärstruktur der <i>L.curvatus</i> L-LDH bei Bedingungen, die zu intermediären Sedimen- tationskonstanten führen.....	64
2.8 Hybridisierungsversuch zum Nachweis der aktiven Form der <i>L.casei</i> L-LDH.....	67

III

	Seite:
3. DISKUSSION.....	72
3.1 Dissoziationseigenschaften.....	72
3.1.1 Einfluß des pH-Wertes.....	72
3.1.2 Wirkung der Effektoren.....	74
3.1.3 Elektrophoretische Beweglichkeit und Quartärstruktur.....	75
3.2 Quartärstruktur und Aktivität.....	75
3.2.1 Beziehung zwischen pH- und Effektor-abhängiger Aktivität und tetramerem Zustand.....	75
3.2.2 Rolle der Effektoren für die Aktivität.....	77
3.2.3 Welche aktive Formen gibt es?.....	78
3.3 Hybridisierbarkeit und chemische Verwandtschaft.....	79
3.4 Reaktivierung.....	80
3.4.1 Einfluß der Denaturierungsmethode.....	80
3.4.2 Gründe für die unvollständige Reaktivierung.....	81
3.4.3 Kinetik.....	81
3.4.4 Mechanismus.....	82
3.5 Schlußbetrachtung.....	84
ZUSAMMENFASSUNG.....	85
MATERIAL UND METHODEN.....	88
1. Reagenzien.....	88
2. Organismen.....	89
3. Anzucht der Organismen.....	89
4. Pufferzusammensetzung.....	91
5. Messung der Enzymaktivität.....	91
5.1 Verwendete Puffer.....	91
5.2 L-LDH-Aktivität mit Pyruvat als Substrat.....	91
5.3 L-LDH-Aktivität mit Lactat als Substrat.....	91
6. Proteinbestimmung.....	92
7. Präparation der Oxamat-Sepharose.....	92
8. Enzymreinigung.....	92
8.1 L-LDH von L.casei und L.curvatus.....	92
8.1.1 Präparation des Rohextraktes.....	92

8.1.2	Hitzebehandlung.....	93
8.1.3	DEAE-Zellulose-Säulen.....	93
8.1.4	Affinitätschromatographie.....	93
8.2	L-LDH von L.plantarum und L.acidophilus....	94
9.	Vorbehandlung der Enzyme zur Untersuchung ihrer kinetischen Eigenschaften.....	94
10.	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	94
10.1	Gel-Elektrophorese bei pH 7,5.....	94
10.2	Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 in Gegenwart von Mn^{2+} und FDP.....	95
10.3	Harnstoff-Gel-Elektrophorese bei pH 8,7....	96
10.4	Gel-Elektrophorese bei pH 8,7 ohne Harn- stoff.....	96
10.5	SDS-Gel-Elektrophorese.....	96
11.	Zentrifugation in der analytischen Ultra- zentrifuge.....	97
11.1	Bestimmung der Sedimentationskonstanten....	97
11.2	Molekulargewichtsbestimmungen.....	97
11.3	Zusatzmessungen.....	98
11.3.1	Dichtemessung.....	98
11.3.2	Viskositätsbestimmung.....	98
11.3.3	Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens.....	99
12.	Denaturierung der L-LDH-asen.....	99
12.1	Denaturierung mit Harnstoff.....	99
12.2	Denaturierung durch Inkubation im Alkali- schen.....	99
13.	Reaktivierung der L-LDH-asen.....	100
14.	Hybridisierung.....	100

LITERATURVERZEICHNIS.....	102
---------------------------	-----

Verwendete Abkürzungen

atm	Atmosphäre(n)
B.	Bacillus
D-LDH	D(-)-Lactat-Dehydrogenase (NAD Oxidoreductase E.C. 1.1.1.28)
D-LDH-asen	Mehrzahl von D(-)-Lactat-Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease I E.C. 3.1.4.5
DTE	1,4-Dithioerythrit
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
h	Stunde(n)
I.P.	Isoelektrischer Punkt
K_M	Michaeliskonstante
L.	Lactobacillus
L-LDH	L(+)-Lactat-Dehydrogenase (NAD Oxidoreductase E.C. 1.1.1.27)
L-LDH-asen	Mehrzahl von L(+)-Lactat-Dehydrogenase
L-LDH H_4	Isoenzym I (Herzmuskel)
L-LDH M_4	Isoenzym V (Skelettmuskel)
M	molar
min	Minute(n)
N	normal
NAD	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxydierte Form)
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sc.	Streptococcus
ssp.	Subspecies
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (internationale Enzymeinheit) = 1 μ Mol/min
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

T E I L I
=====

Reinigung der L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei* und Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften

1. EINLEITUNG

NAD-abhängige Lactatdehydrogenasen spielen im anaeroben Energiestoffwechsel vieler Organismen eine wichtige Rolle. Entsprechend ihrer Spezifität für D(-)-Lactat bzw. L(+)-Lactat lassen sich diese Enzyme in D- und L-LDH-asen einteilen. Erstere sind bei den Bakterien weit verbreitet, wurden aber auch bei Algen, Pilzen (Lé John, 1971) und niederen tierischen Organismen (Long und Kaplan, 1968) beschrieben. L-LDH-asen wurden insbesondere bei zahlreichen taxonomischen Gruppen des Bakterienreiches sowie bei vielen Tierarten - hier treten auch Isoenzyme auf - untersucht.

Ein charakteristischer Unterschied zwischen den D- und L-LDH-asen besteht in ihren unterschiedlichen Molekulargewichten. Während alle bisher untersuchten L-LDH-asen eine tetramere Quartärstruktur mit Molekulargewichten zwischen 130 000 und 150 000 aufweisen, werden für die D-LDH-asen im allgemeinen Molekulargewichte von 65 000 - 80 000 angegeben. Dies spricht für eine dimere Form. Allerdings besteht darüber noch keine endgültige Klarheit.

NAD-abhängige L-LDH-asen verschiedener Vertebraten waren in den letzten Jahren Objekte intensiver Untersuchungen. Nach der erstmaligen Klärung der Quartärstruktur durch Ultrazentri-

fugation und Hybridisierung (Appella und Markert, 1961; Markert, 1963; Jaenicke und Knopf, 1968) konnte durch die Analyse der Primärstruktur der Dornhai M_4 L-LDH (Taylor et al., 1973; 1975; Taylor, 1977) und der Schwein H_4 und M_4 L-LDH (Kiltz et al., 1977) sowie durch die Aufklärung der Tertiärstruktur der genannten Proteine (Adams et al., 1970; Adams et al., 1973; cf. Holbrook et al., 1975; Eventhoff et al., 1975) das Bild der chemisch-physikalischen Eigenschaften dieser Enzyme weitgehend abgerundet werden. Die dynamische Komponente, betreffend die Interaktion der Untereinheiten im tetrameren Verband, wurde durch die Prüfung der enzymatischen Eigenschaften einiger Herz-Muskel Isoenzyme von verschiedenen Vertebraten untersucht (Cahn et al., 1962; Fondy et al., 1964). Hierbei konnte keine gegenseitige Beeinflussung der Untereinheiten festgestellt werden, woraus zu schließen ist, daß sie auch im tetrameren Verband als selbständige Einheiten ihre charakteristischen Eigenschaften zum Ausdruck bringen. Durch Renaturierungsexperimente mit dissoziierter Schweine H_4 L-LDH konnte Jaenicke (1974) die isolierten Untereinheiten als eigenständige aktive Formen ausschließen. Aktive Dimere sind allerdings kürzlich bei der aus Bein- und Schwanzmuskulergewebe isolierten L-LDH von *Homarus americanus* nachgewiesen worden (Eichner und Kaplan, 1977).

Im Gegensatz zur vertieften Kenntnis der Vertebraten L-LDH-asen existieren über bakterielle L-LDH-asen noch relativ wenig Informationen, obwohl hier so interessante regulatorische Phänomene wie die Aktivierbarkeit durch FDP oder zusätzlich noch durch Metallionen beobachtet wurden. FDP aktivierbare L-LDH-asen wurden bei verschiedenen Bakterien gefunden, wie beispielsweise bei Streptokokken (Wolin, 1964; Wittenberger und Angelo, 1970; Jonas et al., 1972; Mou et al., 1972; Brown und Wittenberger, 1972), Bifidobakterien (De Vries et al., 1967), Staphylokokken (Götz und Schleifer, 1975), Mycoplasmen (Neimark und Lemcke, 1972; Neimark und Tung, 1973) und Actinomyceten (Brown et al., 1975), aber auch bei einigen Arten der Gattung *Lactobacillus* (Stetter, 1973). Letztere erschienen insofern interessant, als die hier isolierten L-LDH-asen noch zusätzlich durch 2-wertige

Manganionen aktiviert werden konnten. Über eine durch Mn^{2+} und FDP aktivierbare L-LDH berichtete erstmals De Vries et al. (1970) bei *Lactobacillus casei*. Eine detaillierte Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften wurde von Holland und Pritchard (1975) an einer teilweise gereinigten L-LDH von *L.casei* ssp. *rhamnosus* vorgenommen. Von Gordon und Doelle (1976) wurden bei der bis zur Homogenität gereinigten L-LDH von *L.casei* ATCC 393 sowohl Molekulargewichtsuntersuchungen als auch serologische Studien durchgeführt.

Vergleichende Untersuchungen an L-LDH-asen der Gattung *Lactobacillus* (Stetter, 1973; Kandler und Stetter, 1973) zeigten, daß die aktivierbaren L-LDH-asen nicht nur bei *L.casei* und dessen Unterarten auftreten, sondern auch bei einigen anderen Arten der Untergattung *Streptobacterium*, wie beispielsweise bei *L.curvatus*, *L.sake* und *L.xylosus*. Obwohl die Eigenschaft der allosterischen Aktivierbarkeit durch Mn^{2+} und FDP den L-LDH-asen dieser Arten gemein ist, unterscheiden sie sich sehr deutlich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit (Stetter, 1973). Während in allen Unterarten von *L.casei* das Enzym einen Wanderungsindex von 0,93 bezogen auf die Kaninchen H_4 L-LDH (LDH Iso-I=1,0) aufweist, zeigt die *L.curvatus*- und *L.sake* L-LDH einen Index von 1,64 und das *L.xylosus*-Enzym einen Index von 1,44. Aus ersten vergleichenden Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften der L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* (Stetter, 1973) ergaben sich auch hier größere Unterschiede zwischen den beiden Enzymen.

Um einen Einblick in die Ursache der sich hier abzeichnenden Heterogenität der durch FDP und Mn^{2+} aktivierbaren L-LDH-asen zu erhalten, wurden die Enzyme von *L.curvatus* DSM 20010 und von *L.casei* ATCC 393 bis zur Homogenität gereinigt und eingehend charakterisiert. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, welche allgemeinen enzymatischen Eigenschaften durch die Effektoren beeinflusst werden und inwieweit die Aktivierbarkeit der beiden L-LDH-asen auf gleichen bzw. unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den Effektoren beruht. Hierzu wird im 1. Teil dieser Arbeit der Einfluß der Effektoren auf die Stabilität und

die katalytischen Eigenschaften der L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* beschrieben, während im 2. Teil u.a. die Wirkung von FDP und Mn^{2+} auf den Oligomerenzustand untersucht wird. Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit ist es, Strukturbeziehungen zwischen den Untereinheiten der allosterischen und nicht-allosterischen L-LDH-asen aufzudecken. Dies ist das Ziel des 2. Teils der Arbeit, der Hybridisierungsexperimente zwischen den L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* und den nicht-allosterischen L-LDH-asen von *L.plantarum* und *L.acidophilus* beschreibt. Außerdem befaßt sich dieser Teil mit den mechanistischen Aspekten des Renaturierungsverlaufes von dissoziierter *L.casei* und *L.curvatus* L-LDH und mit der Untersuchung der aktiven Form dieser Enzyme.

2. ERGEBNISSE

2.1 Enzymreinigung

Die L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* wurden durch Hitzebehandlung in Gegenwart von MnSO_4 , durch Affinitätschromatographie über Oxamat-Sepharose und im Fall der *L.casei* L-LDH zusätzlich noch durch Chromatographie über DEAE-Zellulose gereinigt. Die Reihenfolge und der Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte sind in der Tab. 1 dargestellt. Der Reinheitsgrad der Enzyme wurde nach jedem Schritt durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese überprüft. Wie die Abb. 1 zeigt, ist nach dem letzten Reinigungsschritt jeweils nur noch eine Proteinbande vorhanden. Diese Bande entspricht der enzymatisch aktiven L-LDH, wie aus der Abb. 2 zu ersehen ist.

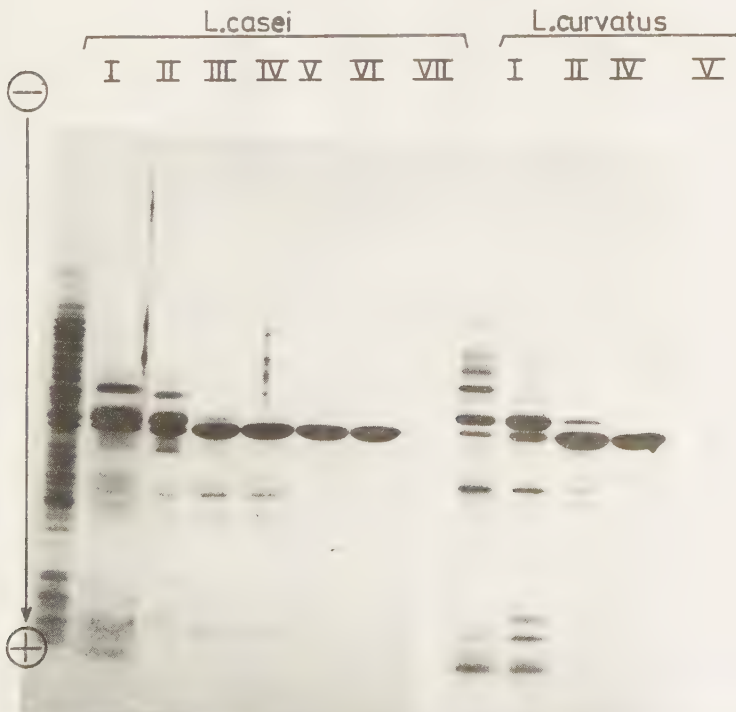


Abb. 1. Gel-Elektropherogramm (exponentielles Polyacrylamid-Gel mit SDS) der Enzymfraktionen während der Reinigung der L-LDH von *L.casei* und *L.curvatus*. Die Fraktionsnummern entsprechen denen von Tab. 1.

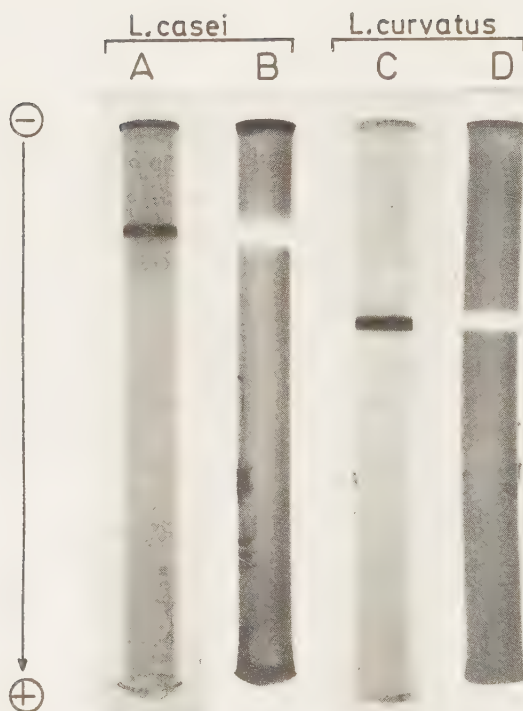


Abb. 2: Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (pH 7,5) der gereinigten *L.casei* und *L.curvatus* L-LDH.

A) Lokalisierung des Proteins

B) Lokalisierung der Aktivität (Reduktion des Pyruvats)

Die gereinigten Enzyme wurden durch Adsorption an DEAE-Zellulose und anschließende Elution mit einem minimalen Volumen an 10 mM Imidazolpuffer pH 6,5 konzentriert. Der Puffer enthielt 2 M NaCl und 0,1 mM FDP und im Fall der *L.curvatus* L-LDH zusätzlich noch 4 mM MnSO_4 .

Die Entfernung des NaCl vom eluierten Enzym erfolgte durch 24-stündige Dialyse gegen Elutionspuffer ohne NaCl. Nach Zugabe von 10 % Glycerin wurden die dialysierten Enzyme in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Tabelle 1: Reinigung der L-LDH von L.casei und L.curvatus

Reinigungsschritt	L.casei			L.curvatus		
	Anreicherung	spezifische Aktivität ⁺	Ausbeute (%)	Anreicherung	spezifische Aktivität ⁺	Ausbeute (%)
I Rohextrakt	-	20	100	-	25	100
II Hitzebehandlung	4,6	230	78	3,4	185	91
III DEAE-Zellulose pH 6,5	9,2	460	61	-	-	-
IV Affinitätschroma- tographie I	26,8	1340	47	29,0	1600	58
V Affinitätschroma- tographie II	30,4	1520	25	37,0	2030	40
VI + VII DEAE-Zellu- lose pH 6,5 und pH 5,5	46,4	2320	6	-	-	-

⁺) $\mu\text{mol/min} \times \text{mg Protein}$

2.2 Stabilität der Enzyme

Die Enzymstabilität der L.curvatus und L.casei L-LDH wurde nach 3 Gesichtspunkten untersucht:

1.) Hinsichtlich der Stabilität während der Dialyse bei 4°C in verschiedenen Puffersystemen und unterschiedlichen pH-Werten, 2.) der Stabilität bei Verdünnung und 3.) der Hitze-stabilität.

2.2.1 Dialyse

Die L-LDH-asen wurden 70 Stunden bei einmaligem Wechsel des Dialysepuffers dialysiert. Das L.casei Enzym ist stabil in Acetatpuffer pH 5,5, in Imidazolpuffer pH 6,5, in Phosphatpuffer pH 6,5 bei Anwesenheit von DTE und in Tris-HCl-Puffer pH 7,5, wenn Mn^{2+} und FDP hinzugefügt werden (Tab. 2).

Tab. 2: Stabilität der L-LDH von L.casei und L.curvatus während der Dialyse (70 Stunden) in verschiedenen Puffersystemen (10 mM) in Abhängigkeit von Mn^{2+} , FDP und DTE.

Puffersystem	Zusatz von: (mM)			pH	% Aktivität nach der Dialyse ^{a)}	
	Mn^{2+}	FDP	DTE		L.casei	L.curvatus
Imidazol	-	-	-	6,5	100	41
Imidazol	6	-	-	6,5	-	100
Imidazol	-	0,5	-	6,5	100	80
Imidazol	6	0,5	-	6,5	100	100
Phosphat	-	-	-	6,5	80	50
Phosphat	-	0,5	-	6,5	83	61
Phosphat	-	-	2	6,5	100	57
Tris	-	-	-	7,5	33	0
Tris	6	0,5	-	7,5	100	36
Acetat	-	-	-	5,5	100	85
Acetat	6	0,5	-	5,5	100	100

a) Standardtest bei pH 4,8

Die L-LDH von *L.curvatus* bedarf schon bei pH 5,5 der Zugabe von Mn^{2+} und FDP und ist bei pH 7,5 (Tris) auch bei Anwesenheit von Mn^{2+} und FDP sehr instabil. Die gereinigten Enzyme wurden deshalb routinemäßig in Imidazolpuffer pH 6,5 mit (*L.curvatus*) und ohne (*L.casei*) Zugabe der Effektoren dialysiert.

2.2.2 Verdünnung

Von den gereinigten L-LDH-asen (0,1 mg/ml) wurden nach 70-stündiger Dialyse gegen pH 5,5 (10 mM Acetatpuffer) verschiedene Verdünnungsstufen bei pH 6,5 (30 mM Imidazolpuffer) und im Fall der *L.curvatus* L-LDH zusätzlich noch bei pH 5,5 (30 mM Acetatpuffer), jeweils mit und ohne Zusatz von Mn^{2+} und FDP hergestellt und nach 2 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur die Aktivität im Standardtest gemessen. Wie aus der Abb. 3 zu ersehen ist, bleibt die *L.curvatus* L-LDH in Gegenwart der Effektoren bis zu einer Konzentration von ca. 10 μ g/ml stabil, während sie bei der Verdünnung ohne Effektoren ab 0,1 mg/ml in zunehmendem Maße inaktiv wird.

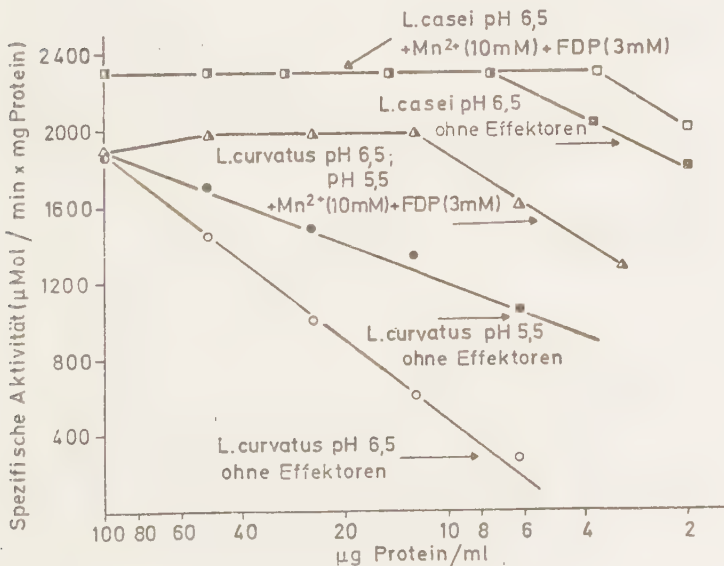


Abb. 3: Stabilität der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH bei verschiedenen Verdünnungen in Abhängigkeit vom pH-Wert (*L.curvatus*) und den Effektoren (*L.curvatus*; *L.casei*).

Dieser Prozeß ist bei pH 6,5 noch deutlicher ausgeprägt als bei pH 5,5. Demgegenüber ist die L.casei L-LDH bei Zusatz der Effektoren bis zu einer Konzentration von ca. 4 µg/ml stabil (Abb. 3). Ein im Vergleich zur L.curvatus L-LDH geringfügiger Aktivitätsverlust bei Verdünnung ohne Effektoren tritt erst im Konzentrationsbereich unter 8 µg/ml ein. Zugabe von Rinder-serumalbumin konnte die L.curvatus L-LDH bei Konzentrationen unter 0,1 mg/ml nicht stabilisieren. Um bei den weiteren Untersuchungen diesen Verdünnungseffekt zu vermeiden, gleichzeitig aber auch im Aktivitätstest einen meßbaren Bereich der NADH-Abnahme zu erhalten, wurden bei dialysierten Enzymlösungen der L.curvatus L-LDH 2 µl einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in den Aktivitätstest eingesetzt.

2.2.3 Hitzestabilität

Erhitzen des Rohextraktes auf 60°C führt bei der L.curvatus L-LDH zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust, während das L.casei Enzym relativ stabil ist. Wie bereits von Stetter (1973) gezeigt wurde, kann aber Mn^{2+} in Verbindung mit FDP das L.curvatus Enzym bei dieser Temperatur weitgehend stabilisieren. Um die Frage der Spezifität von Mangan bezüglich der Hitzestabilisierung und Anreicherung der beiden L-LDH-asen zu klären, wurde der Einfluß verschiedener 2-wertiger Metallionen bei 3 Konzentrationen untersucht. Wie aus der Tab. 3 hervorgeht, kann die L-LDH von L.curvatus nur durch Mn^{2+} und Co^{2+} stabilisiert werden, wobei die optimale Ionenkonzentration 40 mM beträgt. Dabei wird auch ein optimaler Anreicherungsseffekt erreicht.

Demgegenüber wird die Hitzestabilität der L.casei L-LDH durch 2-wertige Metallionen nur geringfügig beeinflusst; sie erhöhen aber den Reinigungsgrad durch Schwermetallfällung von Begleitprotein. Für eine Anreicherung sind besonders Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} und Mn^{2+} geeignet, wobei jedoch nur bei Co^{2+} und Mn^{2+} eine gute Ausbeute zu verzeichnen ist. Erhitzen in Gegenwart von Mn^{2+} ist infolgedessen ein für beide Enzyme geeigneter Reinigungsschritt.

Tab. 3: Einfluß verschiedener 2-wertiger Metallionen auf die Hitzestabilität und Anreicherung der L-LDH von L.casei (60°C; 8 min ; pH 5,5) und L.curvatus (60°C; 4 min ; pH 5,5).

		L.casei		L.curvatus	
Zusatz	Konzentration der Metall- ionen (mM)	Anrei- cherung	Ausbeute (%)	Anrei- cherung	Ausbeute (%)
Kontrolle ohne Metall		2	72	-	3
Ca ²⁺	1	2,2	76,5	-	2
	40	2,6	76,5	-	13
	100	3,6	85,5	-	25,5
Cd ²⁺	1	2,2	76,5	-	2
	40	3,8	76,5	-	6,5
	100	6,5	50	-	3,5
Cu ²⁺	1	2	66,5	-	3
	40	4,8	66,5	-	1
	100	-	4,5	-	0,5
Co ²⁺	1	2	72	-	2
	40	3,1	81	3,4	85
	100	4,3	90	2,6	85
Mg ²⁺	1	2,5	90	-	2
	40	2,6	90	-	5,5
	100	2,8	90	-	11
Mn ²⁺	1	2,1	72	-	1
	40	3,1	85,5	3	85
	100	4,6	85,5	2,6	85
Zn ²⁺	1	2,4	85,5	-	6,5
	40	2,9	40,5	-	4
	100	2,9	40,5	-	4

2.3 Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch die gereinigten Enzyme von *L.casei* und *L.curvatus* wurde mit und ohne Effektoren getestet, wobei Pyruvat in einer Konzentration von 17 mM und die Effektoren in praktisch sättigenden Konzentrationen (3 mM FDP; 10 mM Mn^{2+}) eingesetzt wurden. Wie aus den Abb. 4 a und 4 b zu ersehen ist, erreichen beide Enzyme bei pH 4,5 maximale Umsatzraten, wobei der Verlauf der Optimumskurven in Abwesenheit der Effektoren recht gut übereinstimmt. Bei Zusatz beider Effektoren wird das Optimum jeweils bis in den neutralen Bereich verbreitert.

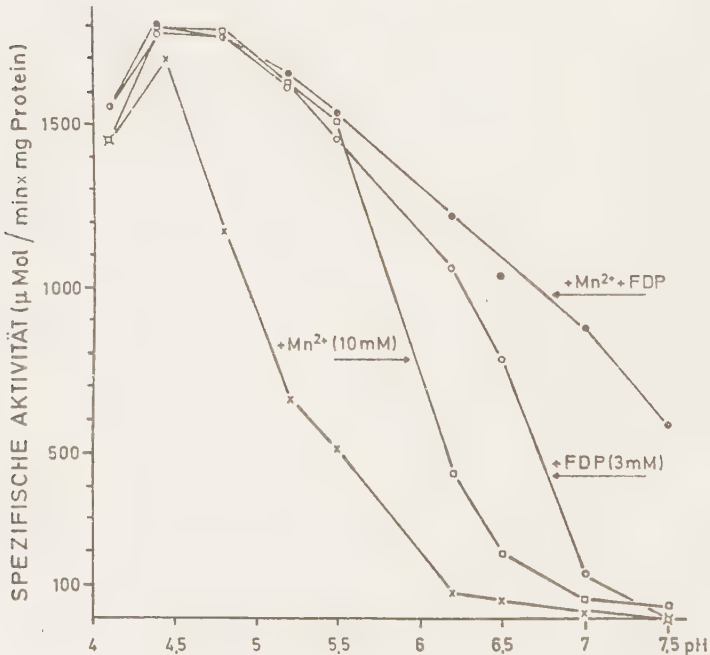
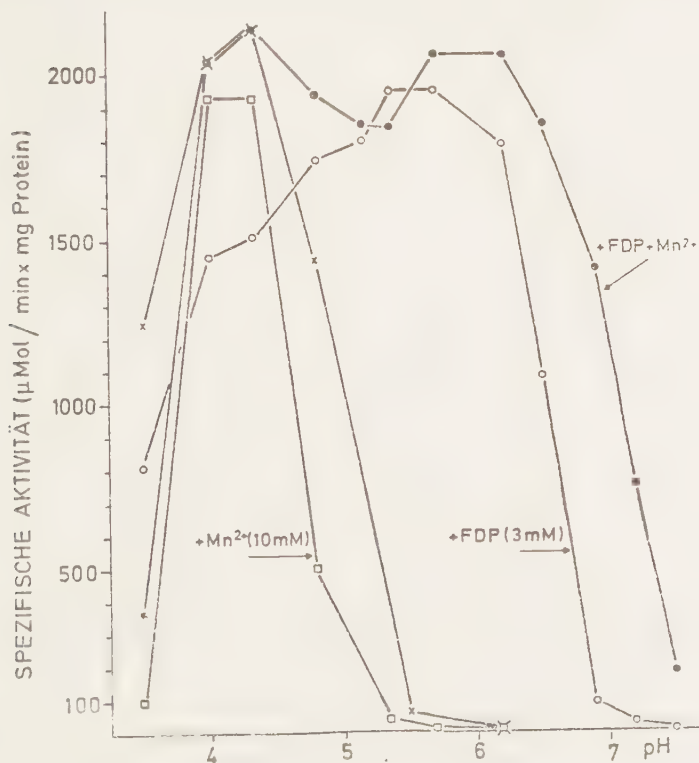


Abb. 4 a: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der *L.curvatus* L-LDH in An- und Abwesenheit der Effektoren
 x — x ohne Effektor
 □ — □ mit Mn^{2+} (10 mM)
 ○ — ○ mit FDP (3 mM)
 ● — ● mit FDP (3 mM) und Mn^{2+} (10 mM)

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Enzymen ergeben sich jedoch, wenn Mn^{2+} oder FDP alleine zugegeben werden. Im Fall der *L. curvatus* L-LDH bewirken die beiden Effektoren im pH-Bereich zwischen pH 4,5 und pH 5,5 jeweils die gleiche Steigerung der Umsatzrate. Erst bei höheren pH-Werten ist FDP effektiver als Mn^{2+} , wobei aber über pH 6,0 die Kombination beider Effektoren noch wesentlich wirksamer ist.

Im Gegensatz hierzu wird die Aktivität der *L. casei* L-LDH gehemmt, wenn Mn^{2+} allein hinzugefügt wird. Zusatz von FDP allein bewirkt eine schwache Hemmung bei pH 4,5 und eine Verschiebung des Optimums nach pH 5,5. Wenn beide Effektoren zusammen eingesetzt werden, bleibt die maximale Umsatzrate praktisch bis pH 6,2 konstant, nimmt dann aber sehr stark ab. Diese Experimente lassen auf signifikante Unterschiede in den allosterischen Eigenschaften der beiden Enzyme, besonders im Hinblick auf den Einfluß des Mn^{2+} , schließen.



2.4 Spezifität der Metallionen-Bedürftigkeit

Neben der Beeinflussung der Enzymstabilität und des Anreicherungseffektes durch verschiedene Metallionen bei der Hitzebehandlung wurde die Spezifität der Enzymaktivierbarkeit durch 2-wertige Metallionen untersucht. Ihr Einfluß wurde bei pH 7,0 getestet, da unter diesen Bedingungen Mn^{2+} in Verbindung mit FDP die relativ höchste Aktivitätszunahme bewirkte. Wie in Abb. 5 a gezeigt wird, verursachen Mn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} in ähnlich niedrigen Konzentrationen eine vergleichbare Stimulation der L.curvatus L-LDH, während Ca^{2+} auch in höheren Konzentrationen nur halb so wirkungsvoll ist. Mg^{2+} zeigt praktisch keinen Effekt.

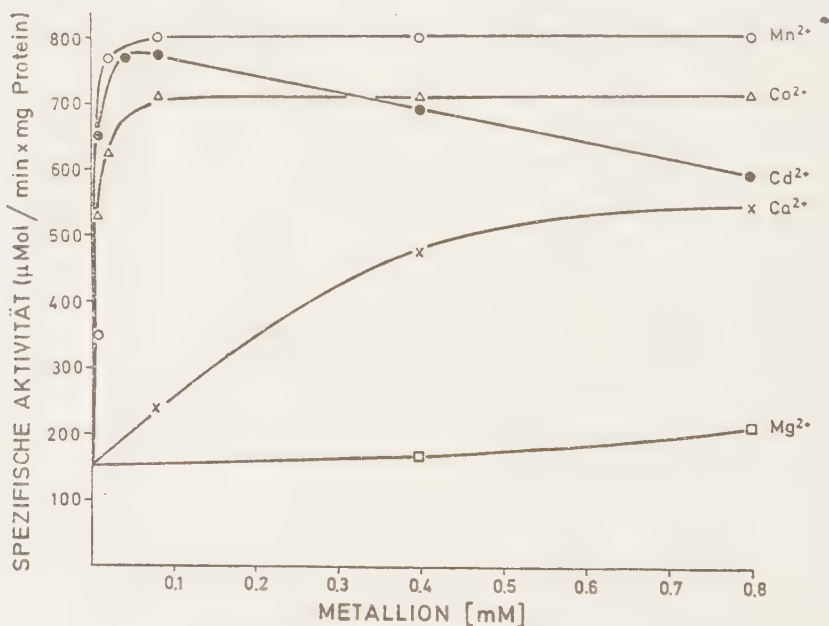


Abb. 5 a: Einfluß verschiedener 2-wertiger Metallionen auf die katalytische Aktivität der L.curvatus L-LDH bei pH 7,0.

- —○ $MnCl_2$ x 4 H_2O
- △ —△ $CoCl_2$ x 6 H_2O
- —● $CdCl_2$ x H_2O
- x —x $CaCl_2$ x 2 H_2O
- —□ $MgCl_2$ x 6 H_2O

Die L-LDH von *L.casei* (Abb. 5 b) bedarf zur Aktivierung im allgemeinen wesentlich höherer Metallionen-Konzentrationen als die von *L.curvatus*. Ca^{2+} ist ebenso effektiv wie Mn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} , wobei ersteres allerdings in höheren Konzentrationen eingesetzt werden muß. Co^{2+} und Cd^{2+} erreichen ihre maximale Stimulation sogar bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen als Mn^{2+} . Cd^{2+} wirkt im höheren Konzentrationsbereich allerdings hemmend.

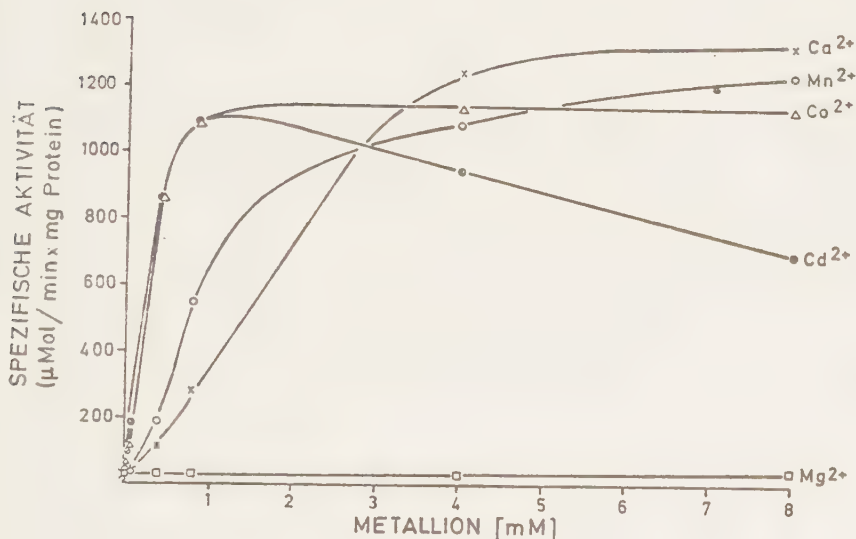


Abb. 5 b: Wie Abb. 5 a, aber *L.casei* L-LDH.

Insgesamt gesehen ist bei beiden L-LDH-asen die aktivierende Wirkung des Mn^{2+} bei neutralem pH weniger spezifisch als der Einfluß des Mn^{2+} auf die Hitzestabilität und die Anreicherung der Enzyme. Betrachtet man beide Effekte, also Stabilisierung während der Hitzebehandlung und Stimulation der Umsatzrate in Gegenwart von LDP bei neutralem pH-Wert, so kann man Co^{2+} und Mn^{2+} als praktisch gleich effektiv werten.

2.5 Die katalytische Aktivität der L-LDH-asen mit Lactat als Substrat

Von D- und L-LDH-asen verschiedener Bakterien (Wittenberger und Fulco, 1967; Tarmy und Kaplan, 1968; De Vries et al., 1970) wurde berichtet, daß sie die Reaktion praktisch nur in einer Richtung katalysieren, wobei die Oxidation von Lactat mit NAD als Coenzym entweder gar nicht oder mit nur ungefähr 0,01 % der Umsatzrate der Pyruvatreduktion abläuft.

Die L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus* zeigen jedoch mit Lactat als Substrat und NAD als Coenzym bei pH 7,0 (40 mM Imidazolpuffer) in Gegenwart von 3 mM FDP und 6 mM Mn^{2+} eine signifikante Lactat-Oxidation. Für die *L.casei* und *L.curvatus* L-LDH wurde ein V_{max} von 200 bzw. 220 $\mu\text{Mol/min} \times \text{mg Protein}$ bestimmt und ein K_M von 0,42 M bzw. 0,28 M. Obwohl V_{max} noch ungefähr 10 % des entsprechenden bei der Reduktion von Pyruvat erreichbaren Wertes beträgt, ist der K_M für Lactat doch 35- (*L.casei*) bzw. 100-fach (*L.curvatus*) höher als der für Pyruvat (Tab. 4). Die katalytische Aktivität der beiden Enzyme beschränkt sich damit praktisch ebenfalls auf nur eine Richtung der an sich reversiblen Reaktion. Detaillierte kinetische Studien wurden deshalb nur für die Reduktion des Pyruvats mit NADH als Coenzym durchgeführt.

2.6 Sättigungsverhalten gegenüber Substrat, Coenzym und Effektoren

Wie bereits aus der Untersuchung des pH-Optimums des Substratumsatzes hervorgeht, ergibt sich ein prinzipieller Unterschied zwischen dem *L.curvatus* und *L.casei* Enzym im Hinblick auf die Wirkung des Mn^{2+} . Um über den Einfluß der Effektoren Mn^{2+} und FDP eine detaillierte Kenntnis zu erhalten, aber auch zur weiteren vergleichenden Charakterisierung der beiden Enzyme, wurde ihr Sättigungsverhalten gegenüber Pyruvat, NADH, Mn^{2+} und FDP untersucht. Eine Zusammenstellung der Daten für die Substrat- bzw. Effektorsättigungen geben Tab. 4 und 5.

Tabelle 4: Einfluß des pH-Wertes und der Effektorkonzentration auf die Kinetik der Substratsättigung der L-LDH von L.casai und L.curvatus.

a) Die K_M -Werte wurden entweder über die Lineweaver-Burk-Auftragung bestimmt (hyperbolische Kurven) oder sie wurden aus der halbmaximalen Umsatzrate erhalten (sigmoide Kurven; apparenter K_M).

pH	Zusatz		L.casai			L.curvatus		
	in 2+	PDP	Pyruvat-sättigungskurve	K_M (mM)	V_{max} (U/mg Protein)	Pyruvat-sättigungskurve	K_M (mM)	V_{max} (U/mg Protein)
7,0	10	3	hyperbolisch	12,0	2400	hyperbolisch	2,4	1000
	-	3	sigmoid	ca. 7,0	ca. 2000	sigmoid	ca. 2,5	ca. 1200
6,2	30	-				sigmoid	ca. 7,0	ca. 1300
	10	3	hyperbolisch	3,0	2500	hyperbolisch	1,1	1400
	-	-	sigmoid	ca. 56,0	ca. 1380	hyperbolisch	66,0	1050
	-	0,3	hyperbolisch	0,74	2000			
5,5	-	3	hyperbolisch	0,65	2000	hyperbolisch	1,0	1300
	10	0,3	sigmoid	ca. 2,4	2000			
	10	3	hyperbolisch	0,71	2000	hyperbolisch	0,83	2000
	-	-	sigmoid	ca. 14,0	ca. 1750	hyperbolisch	14,0	1800
	-	0,3	hyperbolisch	0,55	2400			
4,8	-	3	hyperbolisch	0,49	2000	hyperbolisch	0,66	2000
	10	0,3	sigmoid	ca. 1,6	1900			
	10	3	hyperbolisch	0,45	1900	hyperbolisch	0,66	2000
	10	-	sigmoid	ca. 23,0	ca. 1750	hyperbolisch	0,70	2000

Tabelle 5: Einfluß des pH-Wertes, der Pyruvat- und der Effekorkonzentration auf die Kinetik der FDP und Mn^{2+} -Sättigung der L-LDH von L.casei und L.casei.

a) Die K_M -Werte wurden entweder über die Lineweaver-Burk-Auftragung (hyperbolische Kurven) oder über die halbmaximale Aktivierung (sigmoide Kurven; Kurven mit hohen Umsatzraten in Abwesenheit des betreffenden Effektors; apparenter K_M) bestimmt.

pH	untersuchter Effektor	L.casei			L.casei		
		Pyruvat	Zusätze (mM) Mn^{2+}	Effektor-sättigungs-kurve	K_M (μM)	V_{max} (U/mg Protein)	Effektor-sättigungs-kurve
7,0	FDP	34	10 +	sigmoid	ca. 200	ca. 1500	-
		17	10 +	-	-	-	hyperbolisch
	Mn^{2+}	17	+ 3,0	sigmoid	ca. 1600	ca. 1500	hyperbolisch
		34	- +	sigmoid	ca. 100	ca. 2200	sigmoid
		17	- +	-	-	-	sigmoid
6,2	FDP	34	10 +	hyperbolisch	50	2200	-
		17	0,1 +	-	-	-	hyperbolisch
		17	+ -	-	-	-	sigmoid
		17	+ 0,01	-	-	-	hyperbolisch
		17	+ 0,001	-	-	-	sigmoid
5,5	FDP	34	- +	hyperbolisch	1,3	2100	-
		3	- +	hyperbolisch	4,6	1750	-
		34	1 +	hyperbolisch	13,0	2000	-
		3	10 +	sigmoid	ca. 170	1500	-
		17	- +	-	-	-	hyperbolisch
4,8	FDP	3	- +	hyperbolisch	3,4	2000	-
		3	10 +	sigmoid	ca. 120	ca. 1700	-
		17	+ -	-	-	-	hyperbolisch

2.6.1 Pyruvat-Sättigung der L.curvatus und L.casei L-LDH

Aus den Abb. 6 a und 6 b und der Tab. 4 wird ersichtlich, daß die L.casei L-LDH bei pH 4,8 ohne Zusatz der Effektoren eine sigmoide, die L.curvatus L-LDH hingegen eine hyperbolische Pyruvat-Sättigungskurve aufweist. Die entsprechenden Auftragungen nach Hill (Abb. 7 a und 7 b) sind in beiden Fällen linear, jedoch ist der Hillparameter im Fall der L.curvatus L-LDH ca. 1, während er für die L.casei L-LDH 3,5 beträgt. Letzterer Wert weist auf eine Kooperativität hin, verursacht durch einen homotropen Effekt des Pyruvats, wie er schon für die D-LDH-asen von E.coli (Tarmy und Kaplan, 1968), Butyribacterium rettgeri (Wittenberger und Fulco, 1967) und für die L-LDH von Streptococcus mutans (Brown und Wittenberger, 1972) beschrieben wurde. Bei der L.casei L-LDH verursacht die Zugabe von 10 mM Mn^{2+} eine Hemmung ohne den charakteristischen Verlauf der Pyruvat-Sättigungskurve zu verändern. Die Zugabe von FDP (3 mM) entweder allein oder in Verbindung mit Mn^{2+} (10 mM) resultiert jedoch in einer hyperbolischen Sättigungskurve mit einem Hillparameter von $n = 1,0$. Der apparente K_M für Pyruvat wird um einen Faktor von 30 erniedrigt, V_{max} wird jedoch nur um ungefähr 10-15 % erhöht. Eine 10-fach niedrigere FDP-Konzentration bewirkt nur in Abwesenheit von Mn^{2+} eine hyperbolische Pyruvat-Sättigungskurve (Tab. 4).

Die Erhöhung des pH-Wertes resultiert bei der L.casei L-LDH in einem ebenfalls erhöhten apparenten K_M (Tab. 4). Bei pH 6,2 kann selbst die Zugabe von 3 mM FDP keine Änderung des sigmoiden Kurvenverlaufs bewirken (Abb. 8 a). Der entsprechende Hillparameter liegt immer noch signifikant über 1 (2,0). Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10 mM Mn^{2+} und 3 mM FDP wird die Pyruvat-Sättigungskurve hyperbolisch, und der korrespondierende Hillparameter beträgt ca. 1. Ein hyperbolischer Kurvenverlauf wurde auch bei pH 7,0 in Gegenwart der beiden Effektoren festgestellt, aber der K_M war ähnlich hoch wie bei pH 4,8 ohne Effektoren.

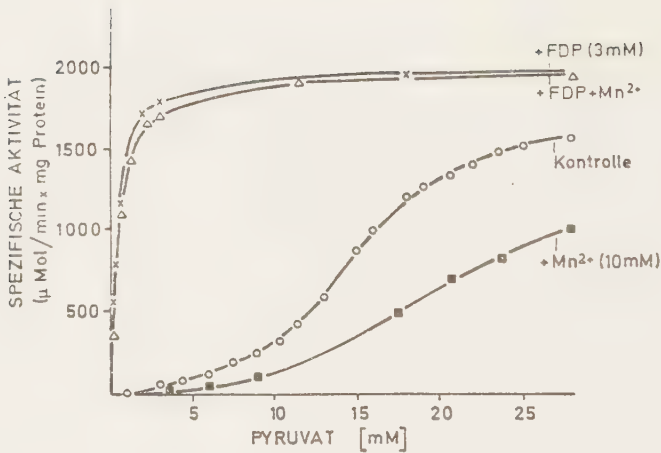


Abb. 6 a: Einfluß der Effektoren auf die Pyruvat-Sättigungs-kurve der *L. casei* L-LDH bei pH 4,8.

- — ohne Effektor
- x — x FDP (3 mM)
- — ■ Mn^{2+} (10 mM)
- Δ — Δ FDP (3 mM) plus Mn^{2+} (10 mM)

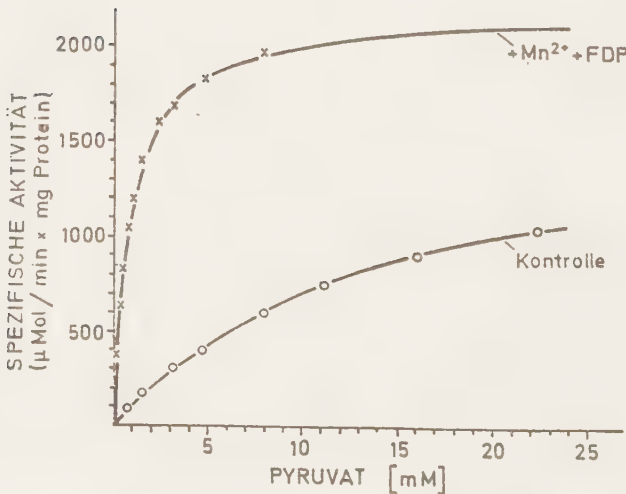


Abb. 6 b: Pyruvat-Sättigung der *L. curvatus* L-LDH bei pH 4,8 (Die Zugabe von entweder 10 mM Mn^{2+} allein oder von 3 mM FDP allein ergab die gleichen Kurven wie bei gemeinsamer Zugabe der beiden Effektoren).

- — ohne Effektor
- x — mit Mn^{2+} (10 mM) und FDP (3 mM)

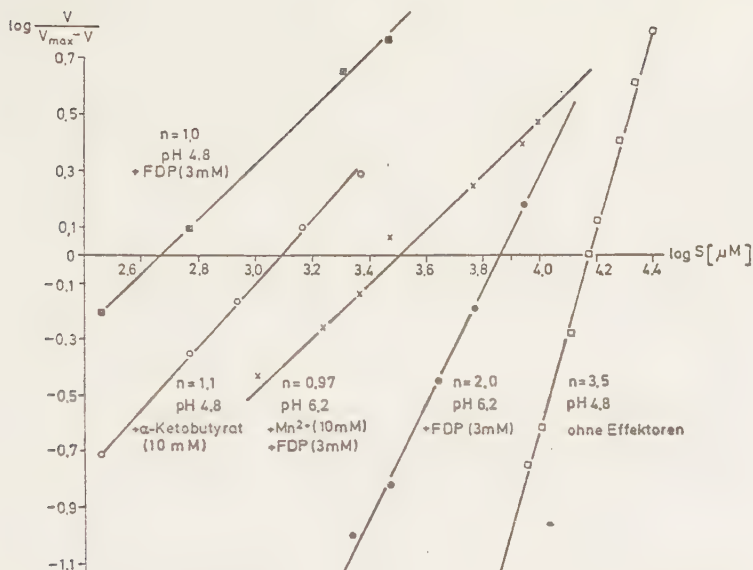


Abb. 7 a: Hill-Auftragung der Pyruvat-Sättigungskinetik der *L. casei* L-LDH.

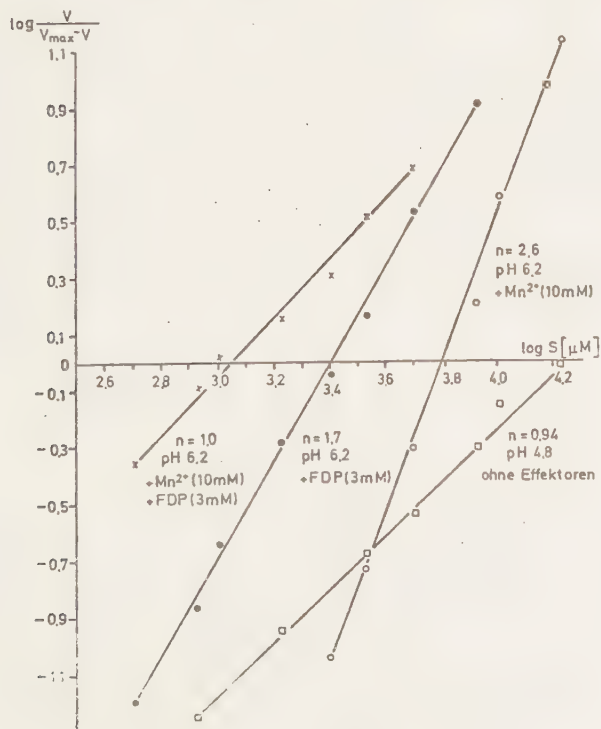


Abb. 7 b: Wie Abb. 7 a, aber *L. curvatus* L-LDH.

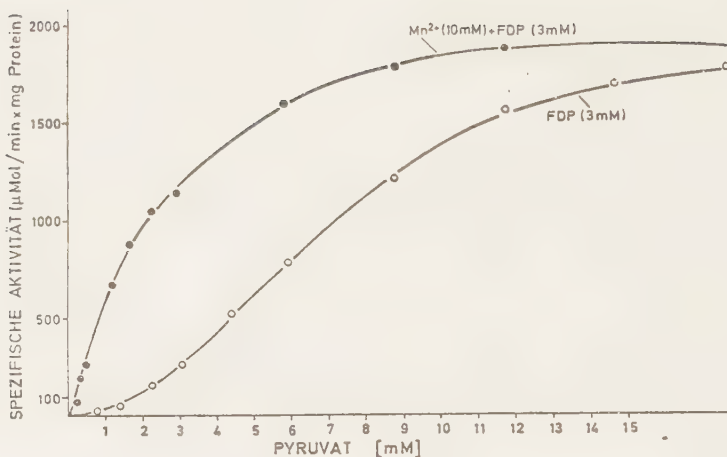


Abb. 8 a: Pyruvat-Sättigungskurve der L.casei L-LDH bei pH 6,2.

Im Gegensatz zur L.casei L-LDH zeigt die L-LDH von L.curvatus bei pH 4,8 und bei pH 5,5 eine hyperbolische Substratsättigungskurve auch ohne Zusatz der Effektoren (Abb. 6 b, Tab. 4). Jedoch nimmt bei pH 4,8 sowohl bei einzelner als auch bei gemeinsamer Zugabe der Effektoren der K_{T1} beträchtlich ab, während die Umsatzrate deutlich ansteigt (in Abb. 6 b ist nur die Kurve bei letzteren Bedingungen dargestellt). Entsprechende Einflüsse der Effektoren ergaben sich auch bei pH 5,5. Bei pH 6,2 kann jedoch nur noch durch die kombinierte Wirkung von Mn^{2+} und FDP eine hyperbolische Kurve erhalten werden, während bei der Zugabe von nur einem Effektor eine sigmoide Substratsättigungskinetik zu verzeichnen ist (Abb. 8 b).

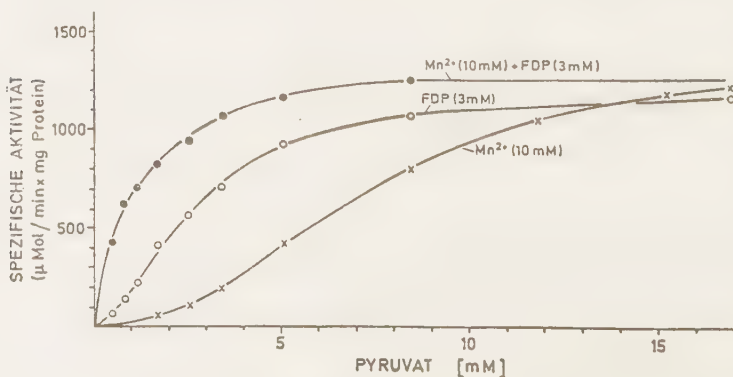


Abb. 8 b: Wie Abb. 8 a, aber L.curvatus L-LDH.

Hiermit übereinstimmend ist der Hillparameter $n = 1,0$ in Gegenwart beider Effektoren, aber $n = 1,7$ bzw. $n = 2,6$, falls nur FDP oder Mn^{2+} vorhanden ist (Abb. 7 b). Wiederum ist der K_M bei Vorliegen beider Effektoren niedriger als der apparente K_M bei Anwesenheit von nur einem Effektor.

2.6.2 Pyruvat-Sättigung der L.casei L-LDH in Gegenwart der Substratanalogen α -Ketobutyrat und Oxamat

Wenn das Substratanalogue α -Ketobutyrat in Abwesenheit der Effektoren in einer Konzentration von 10 mM in den Enzymtest eingesetzt wird, ändert sich der Kurvenverlauf der Pyruvat-Sättigung der L.casei L-LDH von sigmoid nach hyperbolisch (Abb. 9), der Hillparameter nimmt von 3,5 auf 1,1 ab (Abb. 7 a), und der K_M wird um ungefähr 50 % niedriger als der apparente K_M ohne α -Ketobutyrat. V_{max} ändert sich jedoch praktisch nicht.

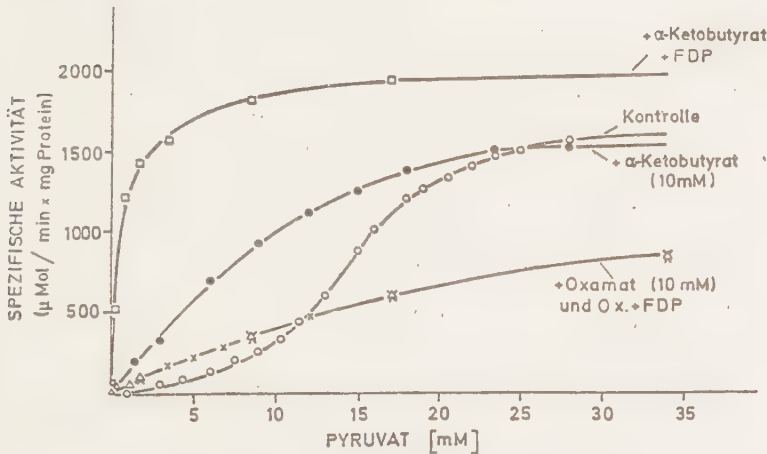


Abb. 9: Einfluß von Substratanalogen auf die Pyruvat-Sättigungskurve der L.casei L-LDH bei pH 4,8.

- — □ FDP (3 mM) plus α -Ketobutyrat (10 mM)
- — ● α -Ketobutyrat (10 mM)
- — ○ ohne Effektoren
- x — x Oxamat (10 mM)
- △ — △ Oxamat (10 mM) plus FDP (3 mM)

Derselbe Effekt wurde schon von Brown und Wittenberger (1972) bei der L-LDH von *Streptococcus mutans* gefunden. Die Wirkung des α -Ketobutyrates könnte, wie schon von verschiedenen Autoren beschrieben, darauf zurückzuführen sein, daß es Pyruvat zwar an der allosterischen Stelle ersetzen kann, aber nicht an der Substrat-Bindungsstelle.

Es wäre allerdings auch denkbar, daß die katalytische und regulatorische Bindungsstelle für Pyruvat identisch ist. Die sigmoide bzw. hyperbolische Substratsättigungskinetik in Ab- bzw. Anwesenheit von α -Ketobutyrat könnte allein durch die Interaktion mehrerer Untereinheiten erklärt werden. Durch die Bindung von Pyruvat an eine oder mehrere Untereinheiten werden Konformationsänderungen im Gesamtmolekül induziert, die die Affinität zum Substrat wesentlich erhöhen. Wenn dieselbe Wirkung auch durch die Bindung von α -Ketobutyrat an die Substratbindungsstelle ausgelöst werden könnte und damit die Affinität zum Pyruvat nun so stark erhöht würde, daß sie ein Vielfaches der Affinität des Enzyms zu α -Ketobutyrat betragen würde, könnten die bereits gebundenen Effektormoleküle (α -Ketobutyrat) mühelos gegen Substratmoleküle ausgetauscht werden, und die Kooperativität der Substratbindungsstellen wäre nicht mehr sichtbar. Eine kompetitive Hemmung, wie sie bei diesem Modell zu erwarten wäre, würde erst bei einem sehr großen Überschuß an α -Ketobutyrat auftreten, vorausgesetzt, die Affinität des ungefalteten Enzyms zu Pyruvat ist wesentlich höher als zu α -Ketobutyrat.

Wie aus der Abb. 9 hervorgeht, ist α -Ketobutyrat aber weit weniger effektiv als FDP, das eine wesentlich stärkere Abnahme des K_M -Wertes und eine signifikante Erhöhung von V_{max} bewirkt. Die Kombination von FDP und α -Ketobutyrat ergibt dieselbe Kinetik wie die Zugabe von FDP allein.

Oxamat, das bei L-LDH-asen verschiedener Herkunft als Substratanaloges bekannt ist, hemmt die Aktivität der *L. casei* L-LDH auch in Anwesenheit von FDP (Abb. 9). Im Gegensatz zu den Ergebnissen, wie sie von Brown und Wittenberger (1972) für die *Streptococcus mutans* L-LDH beschrieben wurden, verändert Oxamat

aber auch den Charakter der Pyruvat-Sättigungskurve. Entsprechend den für die Wirkungsweise des α -Ketobutyrates dargestellten Modellen würde dies bedeuten, daß Oxamat entweder sowohl an die katalytische als auch an die regulatorische Stelle gebunden wird - mit größerer Affinität zur Substrat-Bindungsstelle als α -Ketobutyrat - oder aber nur an die Substrat-Bindungsstelle. Auch nach der letzteren Alternative wäre für Oxamat eine höhere Affinität anzunehmen als für α -Ketobutyrat.

2.6.3 Abhängigkeit der Umsatzrate von der Mn^{2+} -Konzentration

Die Mn^{2+} -Sättigungskurve der L.curvatus L-LDH ist bei niederem pH-Wert auch ohne FDP hyperbolisch (Abb. 10, Tab. 5).

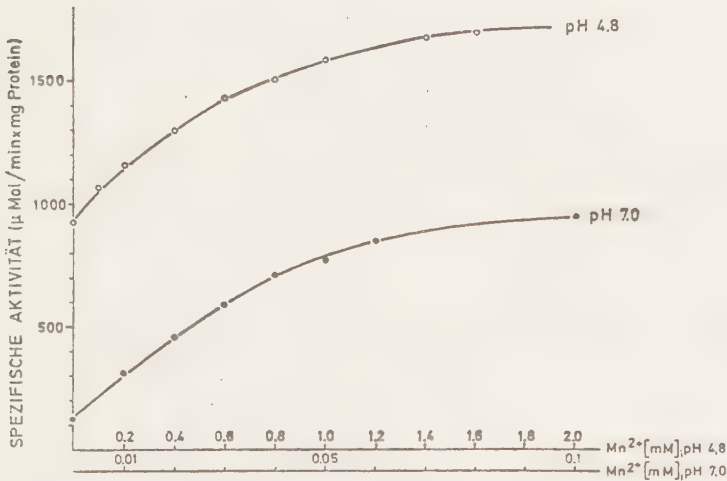


Abb. 10: Mn^{2+} -Sättigungskurve der L.curvatus L-LDH
 o — o bei pH 4,8 ohne zusätzlichen Effektor
 • — • bei pH 7,0 in Anwesenheit von FDP (3 mM)

Bei pH 6,2 ist sie jedoch bei Abwesenheit von FDP sigmoid, wird aber dann bei Zugabe von 0,01 mM FDP wieder hyperbolisch. Der apparente K_M für Mn^{2+} bei pH 6,2 ist in Abwesenheit von FDP ungefähr 20-fach so hoch wie bei pH 4,8, aber er ist nur noch um 25 % höher in Gegenwart von 0,01 mM FDP. Diese Konzentration ist jedoch fast optimal. Eine der Sättigung von FDP entsprechende

Konzentration (3 mM) konnte zur Messung der Mn^{2+} -Sättigung nicht eingesetzt werden, da das Enzym dann bereits durch FDP optimal aktiviert wird und Mn^{2+} keine zusätzliche Steigerung mehr bewirken kann. Bei pH 7,0 ist in Anwesenheit von FDP (3 mM) die Mn^{2+} -Sättigungskurve hyperbolisch (Abb. 10).

Das L.casei Enzym wird bei niederen pH-Werten durch Mn^{2+} gehemmt. Deshalb konnte eine Sättigungskurve für Mn^{2+} nur bei neutralem pH-Wert aufgestellt werden. Wie aus der Abb. 11 und Tab. 5 hervorgeht, ist sie sigmoid, und der apparente K_M ist relativ hoch (1,6 mM).

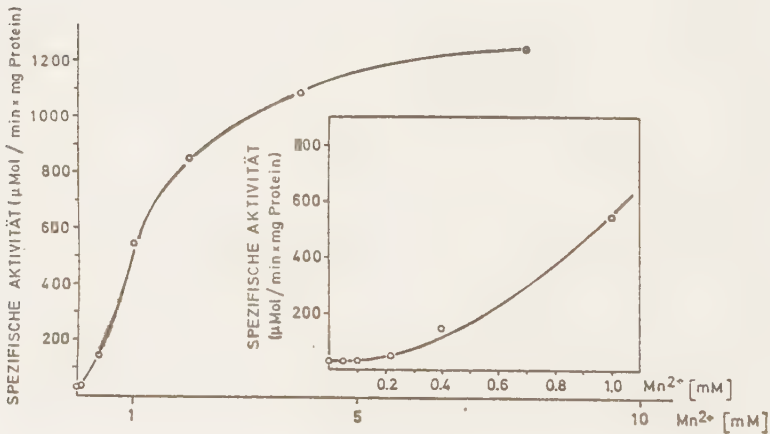


Abb. 11: Mn^{2+} -Sättigungskurve der L.casei L-LDH bei pH 7,0 in Gegenwart von FDP (3 mM).

2.6.4 Abhängigkeit der Umsatzrate von der FDP-Konzentration

Die FDP-Sättigungskurve der L-LDH-asen beider Organismen ist bei niederen pH-Werten (pH 4,8) in Abwesenheit von Mn^{2+} hyperbolisch und wird bei Erhöhung des pH-Wertes sigmoid (Tab. 5).

Im Fall der L.curvatus L-LDH wird die FDP-Sättigungskurve bei Zusatz von Mn^{2+} jedoch wieder hyperbolisch, sogar bei pH 7,0 (Abb. 12).

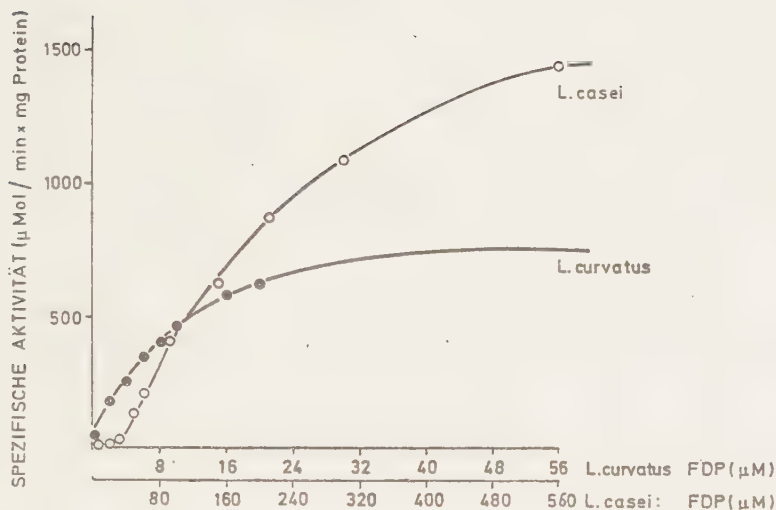


Abb. 12: Abhängigkeit der L-LDH Aktivität von *L.casei* und *L.curvatus* von der FDP-Konzentration bei pH 7,0 in Gegenwart von 10 mM Mn^{2+} . Im Fall der *L.casei* L-LDH enthielt der Standardtest zum Nachweis der Aktivität 34 mM Pyruvat.

Bei der *L.casei* L-LDH wird bei niederen pH-Werten (pH 4,8 und 5,5) durch Zusatz von 10 mM Mn^{2+} der Charakter der Sättigungskurve von hyperbolisch zu sigmoid verändert und umgekehrt bei pH 6,2. Bei pH 7,0 bleibt die Kurve auch bei Anwesenheit von 10 mM Mn^{2+} sigmoid. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen, wie sie von Holland und Pritchard (1975) für die L-LDH von *L.casei* ssp. *rhamnosus* bestimmt wurden.

2.6.5 Abhängigkeit der Umsatzrate von der NADH-Konzentration

Die Umsatzrate der Reduktion von Pyruvat zu Lactat bei pH 4,8 als Funktion der NADH-Konzentration ist in Abb. 13 dargestellt. Bei beiden Enzymen wurde eine hyperbolische Kurve festgestellt, deren Analyse durch die Lineweaver-Burk (1934)-Auftragung K_M -Werte von 45 μM für die *L.curvatus* L-LDH und 33 μM für die *L.casei* L-LDH ergab. Beide Enzyme sind auch mit NADPH als Coenzym

aktiv. Allerdings betragen die maximalen Umsatzraten nur 20 % (L.curvatus) bzw. 15 % (L.casei) derjenigen, wie sie mit NADH als Coenzym erhalten werden.

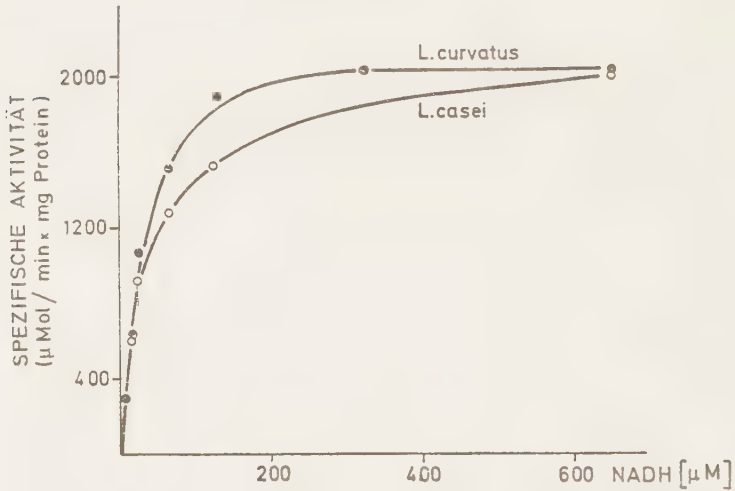


Abb. 13: NADH-Sättigungskurve der *L. curvatus* und *L. casei* L-LDH.

3. DISKUSSION

Die beiden für diese Studien ausgewählten Organismen *L.casei* ssp. *casei* ATCC 393 und *L.curvatus* DSM 20010 sind taxonomisch durch viele charakteristische Merkmale gegeneinander abgegrenzt. Die DNA-Homologie der beiden Stämme beträgt weniger als 20 % (Dellaglio et al., 1975). Beide Stämme unterscheiden sich auch deutlich vom Stamm *L.casei* ssp. *rhamnosus* ATCC 7469, dessen L-LDH von Holland und Pritchard (1975) untersucht wurde. Die DNA-Homologie von ATCC 7469 mit ATCC 393 beträgt weniger als 40 % und mit DSM 20010 weniger als 5 % (Dellaglio et al., 1975). Die elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH von ATCC 7469 ist jedoch identisch mit derjenigen der L-LDH von ATCC 393 (Kandler und Stetter, 1973), während sich die der L-LDH von DSM 20010 beträchtlich unterscheidet. Auch die hier berichteten Ergebnisse zeigen, daß die beiden *L.casei* Stämme sehr ähnlich sind, zumindest in Bezug auf diejenigen Eigenschaften, die von Holland und Pritchard (1975) für das ATCC 7469 Enzym und hier für das ATCC 393 Enzym untersucht wurden.

Auch die L-LDH-Asen von *L.casei* und *L.curvatus* sind sich in einigen mehr allgemeinen Eigenschaften ähnlich, sie unterscheiden sich aber in verschiedenen wichtigen Details sehr deutlich, z.B. in der elektrophoretischen Beweglichkeit bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (pH 7,5).

Unter optimalen Bedingungen zeigen beide Enzyme einen relativ niedrigen K_M (ungefähr 0,5 mM) und sehr hohe Maximalumsätze (ungefähr 2000 $\mu\text{Mol/min} \times \text{mg Protein}$) mit Pyruvat als Substrat, aber sehr hohe K_M -Werte (ungefähr 0,4 M) und niedrige Maximalumsätze mit Lactat als Substrat. Zumindest unter physiologischen Bedingungen dürften die beiden Enzyme im wesentlichen die Reduktion von Pyruvat katalysieren.

Sie zeigen auch das gleiche schmale pH-Optimum um pH 4,5, das durch Zugabe der Effektoren zum Neutralen hin verbreitert wird. Bei niedrigen pH-Werten wird die maximale Umsatzrate durch die Effektoren nur geringfügig erhöht, während der K_M -Wert bzw. der apparente K_M -Wert beträchtlich abnimmt. Bei pH-Werten über pH 6,5 ist die Anwesenheit beider Effektoren notwendig um die Enzyme zu aktivieren, wobei der K_M -Wert, wenigstens bei der L.casei L-LDH, jedoch wesentlich höher ist als bei optimalen Bedingungen.

Im Gegensatz zu allen anderen bekannten allosterischen LDH-asen (Wolin, 1964; De Vries et al., 1967; Tarmy und Kaplan, 1968; Wittenberger und Fulco, 1967; Wittenberger und Angelo, 1970; Jonas et al., 1972; Neimark und Lemcke, 1972; Schleifer und Kocur, 1973) benötigen beide Enzyme für die Aktivierung bei neutralem pH außer FDP noch 2-wertige Metallionen. Mn^{2+} und Co^{2+} erweisen sich als die am besten geeigneten Ionen, während Mg^{2+} bei beiden Enzymen keinen Effekt zeigt.

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Enzymen bestehen hinsichtlich ihrer Stabilität unter verschiedenen Bedingungen und ihrer Reaktionskinetiken, besonders was den Einfluß von Mn^{2+} betrifft. Während die L.casei L-LDH gegen Erhitzen auf 60°C, bei Verdünnen unter eine Konzentration von 0,1 mg/ml und während der Dialyse in Abwesenheit von Effektoren sehr stabil ist, benötigt das L.curvatus Enzym unter diesen Bedingungen sogar bei niederen pH-Werten die Effektoren zur Stabilisierung.

Dieses unterschiedliche Verhalten wird möglicherweise durch dieselben strukturellen Unterschiede bedingt, die auch für die verschiedenen Reaktionskinetiken verantwortlich sind. Während die Pyruvat-Sättigungskurve der L.curvatus L-LDH bei niederem pH-Wert hyperbolisch ist und erst bei pH 6,2 sigmoid wird, ist sie bei der L.casei L-LDH sogar bei niederem pH-Wert sigmoid und wird erst durch die Zugabe von FDP oder des Substratanalogen

α -Ketobutyrat bzw. Oxamat hyperbolisch. Man kann also das L.casei Enzym dem gemischten homotropen-heterotropen Typ zu-

ordnen, wobei sowohl das Substrat und seine Analogen als auch andere Metaboliten als Modulatoren wirken. Die L.curvatus L-LDH scheint jedoch bei niederen pH-Werten heterotrop zu sein, verhält sich jedoch bei höherem pH-Wert wie ein Enzym vom gemischten Typ.

Auch die pH-Abhängigkeit der Mn^{2+} -Wirkung ist bei den beiden L-LDH-asen verschieden, während die der FDP-Wirkung sehr ähnlich ist. Mn^{2+} verursacht bei dem L.curvatus Enzym bei niederem pH-Wert in Abwesenheit von FDP eine deutliche Abnahme des K_M -Wertes für Pyruvat und eine geringe Erhöhung von V_{max} . Demgegenüber hemmt es bei denselben Bedingungen das L.casei Enzym. Hier wird Mn^{2+} nur in Kombination mit FDP bei pH-Werten über pH 6,2 zum positiven Effektor.

Wie von Holland und Pritchard (1975) ausgeführt wurde, kann die ausgesprochene Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert und von Metallionen durch die Interaktion negativ geladener Gruppen des Enzyms und des Aktivators (FDP) mit Metallionen erklärt werden, wobei die sich gegenseitig abstoßenden Kräfte, die zu einer Abnahme der Affinität führen, reduziert würden. Die offensichtlichen Unterschiede zwischen den beiden L-LDH-asen sind wohl eher auf Ladungsunterschiede in der Nachbarschaft der Bindungsstelle für FDP oder in den für die Interaktion von Untereinheiten wichtigen Strukturbereichen eines enzymatisch aktiven Oligomers zurückzuführen als auf grundlegende Unterschiede zwischen den Polypeptidketten. Diese Frage wird im nächsten Teil, der sich unter anderem mit der Aufklärung der Quartärstruktur der beiden Enzyme und dem Einfluß des pH-Wertes und der Effektoren Mn^{2+} und FDP auf den Oligomerenzustand befaßt, nochmals diskutiert.

T E I L I I
=====

Versuche zur Quartärstruktur

1. EINLEITUNG

Die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der beiden durch Mn^{2+} und FDP aktivierbaren L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* ergab eine sehr komplexe Abhängigkeit ihrer Aktivität vom pH-Wert und von der Anwesenheit der beiden Effektoren. Beiden Enzymen gemeinsam ist ein pH-Optimum des Substratumsatzes in einem eng begrenzten pH-Bereich im Sauren. Durch Zugabe der beiden Effektoren kann der aktive Zustand jedoch bis ins Neutrale stabilisiert werden. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Enzymen ergibt sich durch den unterschiedlichen Einfluß des Mangans. Während es bei der *L.casei* L-LDH erst bei pH-Werten $> pH\ 5,5$ im Zusammenwirken mit FDP einen positiven Einfluß auf die Enzymaktivität und die Substrataffinität hat und bei niedrigeren pH-Werten sogar die Aktivität des Enzyms hemmt, wirkt es bei der *L.curvatus* L-LDH schon bei pH 4,8 als positiver Effektor, indem es wie FDP die Affinität zum Substrat deutlich erhöht. Die bei beiden Enzymen vorhandene, wenn auch bei der *L.casei* L-LDH stärker ausgeprägte Kooperativität der Substratbindungsstellen weist auf eine oligomere Struktur als aktive Einheit hin.

Voruntersuchungen (Stetter, 1973) an angereicherten Enzympräparationen lieferten bereits Hinweise darauf, daß der Quartärstruktur der beiden Enzyme ein tetramerer Aufbau zugrunde liegt, wie er für die Rinder H_4 L-LDH bereits 1961 (Appella und

Markert) beschrieben und für verschiedene Vertebraten L-LDH-asen durch Ultrazentrifugation (Jaenicke und Knopf, 1968), Hybridisierungsversuche (Markert, 1963; Anderson und Weber, 1966) und Röntgenstrukturanalyse (Adams et al., 1970; Adams et al., 1973; cf. Holbrook et al., 1975) eindeutig bestätigt wurde. Diesem Bauprinzip folgen auch die bisher genauer untersuchten Invertebraten - (Kaloustian et al., 1969; Burke et al., 1972) und Bakterien L-LDH-asen (Jago et al., 1971; Dynon et al., 1972; Yoshida und Freese, 1965; Gordon und Doelle, 1976). Es lag nahe anzunehmen, daß die Wirkung der Effektoren und des pH-Wertes auf die Aktivität der L.casei und L.curvatus L-LDH wenigstens teilweise über Quartärstrukturveränderungen zustande kommt. Unterstützt wurde diese Vorstellung durch die in den schon erwähnten Vorversuchen ersichtliche Dissoziierbarkeit der L.curvatus L-LDH im schwach basischen pH-Bereich und ihrer im Vergleich zu den L-LDH-asen der meisten anderen Streptobakterien großen elektrophoretischen Beweglichkeit (Stetter, 1973), für die eine Dissoziation in Untereinheiten eine plausible Erklärung wäre. Daß Effektoren nicht nur die Aktivität sondern auch den Quartärzustand beeinflussen können, wurde schon von Jago et al. (1971) für die FDP aktivierbare L-LDH von *Sc. cremoris* US₃ beschrieben. Im folgenden soll mittels Ultrazentrifugationsexperimenten die Quartärstruktur der beiden L-LDH-asen aufgeklärt und der Einfluß der Effektoren Mn^{2+} und FDP sowie des pH-Wertes auf ihren Oligomerenzustand untersucht werden.

Die Ähnlichkeit im kinetischen Verhalten der beiden Enzyme legt die Vermutung nahe, daß sie auch gewisse strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Konkrete Hinweise dafür konnten von Hensel (1977) durch immunologische Studien mit Antiseren gegen die beiden allosterischen L-LDH-asen erbracht werden. Demnach können für diese beiden Enzyme weitgehende Übereinstimmungen in ihrer Oberflächenstruktur angenommen werden. Bei diesen Untersuchungen ergaben sich, wenn auch in geringerem Ausmaß, Ähnlichkeiten zwischen den beiden allosterischen Enzymen und verschiedenen nicht allosterischen L-LDH-asen bakterieller Herkunft, wie der

von *L.acidophilus* und *L.plantarum*. Diese immunologischen Studien ermöglichen zwar qualitative Aussagen über Veränderungen der Oligomerenoberfläche, sie geben aber keinen Aufschluß über strukturelle Beziehungen der funktionell wichtigen Interaktionsbereiche der Untereinheiten. Informationen über derartige Strukturbeziehungen können aus Hybridisierungsexperimenten erhalten werden. Die Bildung von aktiven Hybridkombinationen zwischen 2 Enzymen ist ein Hinweis dafür, daß im Interaktionsbereich der Untereinheiten gewisse Übereinstimmungen vorhanden sein müssen. Aufgrund der Hybridisierbarkeit von L-LDH-asen sehr verschiedener Vertebratenklassen vermuteten schon Chilson et al. (1965), daß während der Evolution ein großer Teil der für die Bildung des tetrameren Zustandes wichtigen Strukturen erhalten geblieben ist. Primärstrukturanalysen von L-LDH-asen verschiedener höherer Organismen (Taylor et al., 1973; Taylor et al., 1975; Taylor, 1977; Kiltz et al., 1977) zeigen in der Tat weitgehende Sequenzhomologien in den für die Interaktion der Untereinheiten wichtigen Strukturbereichen (Rossmann et al., 1973; cf. Holbrook et al., 1975). Außer bei L-LDH-asen konnten in vitro Hybridisierungen auch bei zahlreichen anderen Enzymen wie Aldolasen (Penhoet et al., 1967), Malatdehydrogenasen (Chilson et al., 1965) oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen (Suzuki et al., 1976) durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Hybridisierungsversuche befassen sich mit den allosterischen L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus* und den nicht durch FDP und Mn^{2+} aktivierbaren L-LDH-asen von *L.acidophilus* und *L.plantarum*, deren enzymatische Eigenschaften von Gasser et al. (1970) bzw. von Dennis und Kaplan (1960) beschrieben wurden. Durch diese Experimente sollen Aufschlüsse darüber erhalten werden, inwieweit die aus den immunologischen Studien (Hensel, 1977) ersichtlichen unterschiedlichen Ähnlichkeitsbeziehungen der Enzymoberfläche zwischen den allosterischen L-LDH-asen einerseits und den allosterischen und nicht allosterischen Enzymen andererseits auch auf die Interaktionsbereiche der Untereinheiten zutreffen oder ob diese funktionell wichtigen Bereiche möglicherweise auch bei den

bakteriellen L-LDH-asen, unabhängig von besonderen Eigenschaften wie der allosterischen Regulierbarkeit, konservative Strukturen darstellen.

Voraussetzung für die Hybridisierung von oligomeren Proteinen ist ihre reversible Dissoziation in Untereinheiten. Dies wurde bei verschiedenen Enzymen wie beispielsweise bei L-LDH-asen oder Malatdehydrogenasen durch Anwendung mehr oder weniger drastischer Denaturierungsmethoden wie Veränderung des pH-Wertes (Anderson und Weber, 1966; Jaenicke, 1974) oder Inkubation in hoch-molaren Harnstoff- und Guanidin-HCl-Lösungen (Chilson et al., 1964; Chilson et al., 1965) erreicht, wobei besonders die beiden letzteren Methoden auch zu einer starken Entfaltung der Polypeptidketten führen. Die durch Hybridisierungsexperimente und Ultrazentrifugation nachgewiesene Wiederherstellung der oligomeren Struktur sowie die, wenn auch unterschiedliche, Reaktivierbarkeit dieser Proteine zeigt, daß nicht nur die Dissoziation in Monomere, sondern auch die Entfaltung der Untereinheiten reversibel verlaufen kann. Die mechanistischen Aspekte der bei der Renaturierung stattfindenden intra- und intermolekularen Neuordnung wurden in den vergangenen Jahren bei mehreren Enzymen mit Hilfe verschiedener Methoden wie ORD- und Fluoreszenzmessungen, Messung der Reaktivierungskinetik und Hybridisierungsversuche untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß z.B. Cofaktoren und Substrate sowohl die Reaktivierungsrate als auch den Reaktivierungsgrad beeinflussen können (Chilson et al., 1965; Chilson et al., 1966; Teipel und Koshland, 1971). Über einen detaillierten Renaturierungsmechanismus bei der Schwein H_4 und M_4 L-LDH berichteten kürzlich Tenenbaum-Bayer und Levitzki (1976). Demnach wird bei diesen Enzymen sowohl die Reaktivierung als auch die durch Fluoreszenzmessungen beobachtbare Wiederherstellung der Struktur durch eine geschwindigkeitslimitierende Umfaltungsreaktion der Monomeren bestimmt. Für die Abfolge der Reassoziierungsreaktionen nehmen die Autoren die Bildung von Dimeren und deren anschließende Zusammenlagerung zur tetrameren Quartärstruktur an.

Ob ein entsprechender Mechanismus auch für die allosterischen L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* anzunehmen ist, soll durch die Untersuchung der Reaktivierungseigenschaften der beiden Enzyme in Abhängigkeit von der De- und Renaturierungsmethode und durch die Untersuchung des Renaturierungsweges der *L.casei* L-LDH nach Harnstoffdenaturierung geprüft werden. Darüber hinaus wird mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten versucht, Aufschluß über die aktive Einheit der *L.casei* L-LDH zu geben.

2. ERGEBNISSE

2.1 Einfluß des pH-Wertes und der Effektoren auf die Sedimentationskonstante und das Molekulargewicht der L-LDH von L.curvatus und L.casei

Zur Bestimmung der Molekulargewichte (Gleichgewichtszentrifugation) und der Sedimentationskonstanten in der analytischen Ultrazentrifuge wurden die Proben 80 Stunden gegen 15 mM Puffer bei den in Tab. 6 aufgeführten Bedingungen dialysiert. Da Imidazolpuffer in Konzentrationen über 50 mM Imidazol hemmend auf die Aktivität der L.casei L-LDH wirkt, wurden die Konzentrationen aller Puffer gleichermaßen niedrig gehalten.

Der Einfluß der Proteinkonzentration auf die Sedimentationskonstante wurde für die L.casei und L.curvatus L-LDH im Konzentrationsbereich von 0,4 mg/ml - 1,8 mg/ml bei pH 5,5 geprüft. Es konnte keine Abhängigkeit der $s_{20,w}$ -Werte von der Proteinkonzentration nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte über die Auftragung von $\log c$ gegen r^2 (c entspricht der Proteinkonzentration im Abstand r vom Rotormittelpunkt). In Abb. 14 a und 14 b ist diese Auftragung für die L.casei L-LDH bei pH 5,0 und für die L.curvatus L-LDH bei pH 7,4 beispielhaft dargestellt.

Die für die L.curvatus und L.casei L-LDH bei pH 5,0 ohne Effektoren und bei pH 5,5 bzw. pH 7,4 in Anwesenheit von Mn^{2+} und FDP bestimmten Molekulargewichte variieren zwischen 140 000 und 150 000 (Tab. 6). Diese Größenordnung entspricht der von anderen Organismen bekannten tetrameren Form der L-LDH-asen (Appella und Markert, 1961; Jaenicke und Knopf, 1968; Burke et al., 1972; Jago et al., 1971; Dynon et al., 1972; Yoshida und Freese, 1965; Gordon und Doelle, 1976; Götz und Schleifer, 1975). Ebenso wie die Molekulargewichte stimmen auch die bei pH 5,5 ohne und bei pH 7,0 mit Effektoren bestimmten Sedimentationskonstanten (Tab. 6) von ca. 7 S gut mit den in der Literatur für die tetramere Form der L-LDH-asen angegebenen Werten überein (Jaenicke und Knopf,

1968; Yoshida und Freese, 1965; Burke et al., 1972; Jago et al., 1971; Dynon et al., 1972). Auch für die Sedimentationskonstanten der beiden nicht aktivierbaren L-LDH-asen von *L.acidophilus* und *L.plantarum* wurden bei pH 5,5 entsprechende Werte von 7,2 S bzw. 7,0 S gefunden.

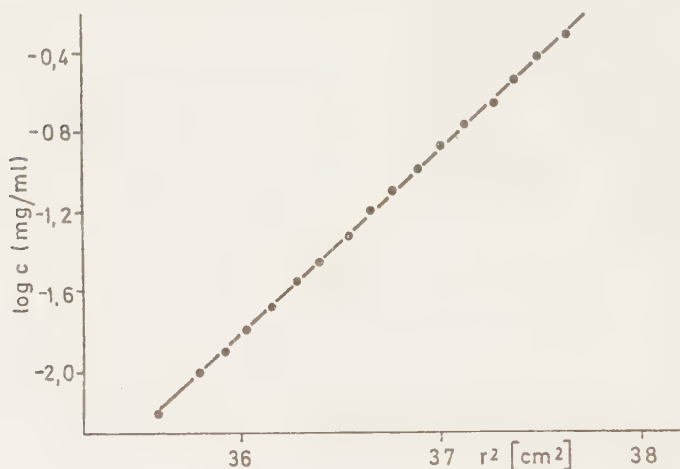


Abb.14 a: Auftragung von $\log c$ gegen r^2 , erhalten aus der Gleichgewichtszentrifugation der *L.casei* L-LDH bei pH 5,0 (15 mM Acetatpuffer). Experimentelle Bedingungen: 20°C; Ausgangskonzentration des Proteins: $c_0 = 0,2$ mg/ml; 16 000 UPM.

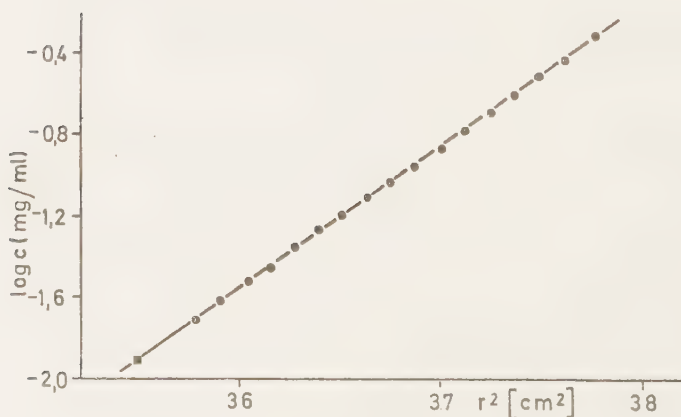


Abb.14 b: Wie Abb. 14 a, aber *L.curvatus* L-LDH bei pH 7,4 (15 mM Imidazolpuffer). Experimentelle Bedingungen: 20°C; Ausgangskonzentration des Proteins: $c_0 = 0,15$ mg/ml; 28 000 UPM.

Tabelle 6: Sedimentationskonstanten und durch Gleichgewichtszentrifugation bestimmte Molekulargewichte der L-LDH von L.curvatus und L.casei. Die Proteinkonzentrationen betrugen 0,45 mg/ml (Bestimmung der $s_{20,w}$ -Werte) bzw. 0,15 - 0,2 mg/ml (Molekulargewichtsbestimmung).
Partielles spezifisches Volumen: V_{L.curvatus} = 0,7437; V_{L.casei} = 0,7404

Bedingungen			Herkunft der L-LDH					
pH	Puffer (15 mM)	Effektoren Mn ²⁺	Effektoren (mM)		L. curvatus		L. casei	
			FDP		M _{app}	s _{20,w} ^c	M _{app}	s _{20,w} ^c
5,0	Acetat	-	-		147000	-	141000	-
5,5	Acetat	-	-		-	6,9	-	6,9
6,4	Imidazol	-	-		-	4,6	-	-
7,0	Imidazol	-	-		-	3,5	-	6,83
7,4	Imidazol	-	-		35000	2,64	-	-
9,2	Tris	-	-		-	-	34000	2,75
5,5	Acetat	10	0,5		146000	-	144000	-
7,0	Imidazol	10	0,5		-	7,1	-	7,0
7,4	Imidazol	-	3		-	2,9	-	-
7,4	Imidazol	0,5	-		-	3,95	-	-
7,4	Imidazol	10	0,5		140000	-	-	-
9,2	Tris	-	0,5		-	-	36000	-

Wie aus der Tab. 6 weiter hervorgeht, lassen sowohl die $s_{20,w}^C$ -Werte als auch die Molekulargewichte der L.curvatus und L.casei L-LDH eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert erkennen. Im pH-Bereich von pH 5,0-pH 5,5 entsprechen die Molekulargewichte und $s_{20,w}^C$ -Werte der tetrameren Form. Bei pH 6,4 beträgt der $s_{20,w}^C$ -Wert der L.curvatus L-LDH nur noch 4,6 S, bei pH 7,0 noch 3,5 S und bei pH 7,4 schließlich nur 2,64 S. Dem letzteren Wert entspricht ein Molekulargewicht von 35 000. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der monomeren Form der bekannten L-LDH-asen. Eine entsprechende Abnahme der Sedimentationskonstante und des Molekulargewichtes tritt bei der L.casei L-LDH erst erheblich über pH 7,0 auf. Der $s_{20,w}^C$ -Wert von 6,83 S bei pH 7,0 zeigt, daß im Neutralen noch weitgehend der tetramere Zustand vorliegt. Bei pH 9,2 ergibt sich dagegen ein Molekulargewicht von 34 000 und ein $s_{20,w}^C$ -Wert von 2,75 S, die dem monomeren Zustand entsprechen.

Außer durch den pH-Wert wird die Quartärstruktur der L.curvatus L-LDH durch die Effektoren Mn^{2+} und FDP beeinflusst. Während bei pH 7,4 ohne Effektoren das Enzym in Monomere dissoziiert ist, liegt es in Anwesenheit der beiden Effektoren auch bei pH 7,4 im tetrameren Zustand vor (Molekulargewicht: 140 000). Die Wirkung von Mn^{2+} bzw. FDP alleine kommt durch die veränderten $s_{20,w}^C$ -Werte bei pH 7,4 in Anwesenheit von nur einem der beiden Effektoren zum Ausdruck. FDP (3 mM) alleine bewirkt nur eine geringe Erhöhung des $s_{20,w}^C$ -Wertes von 2,64 S auf 2,9 S, Mn^{2+} (0,5 mM) alleine bewirkt dagegen eine erheblich stärkere Steigerung auf 3,95 S. Höhere Mn^{2+} -Konzentrationen in Abwesenheit von FDP konnten nicht eingesetzt werden, da sie zur Denaturierung des Enzyms führten. Entsprechende Untersuchungen konnten an der L.casei L-LDH wegen der Instabilität von Mn^{2+} in dem für dieses Enzym nötigen basischen Bereich nicht durchgeführt werden. Die Zugabe von FDP (0,5 mM) alleine konnte die Dissoziation der L.casei L-LDH in Monomere bei pH 9,2 nicht verhindern (Molekulargewicht: 36 000).

Um auszuschließen, daß die bei Zugabe der Effektoren und bei der Verschiebung der pH-Werte auftretenden Effekte durch die unter

Diesen Bedingungen unterschiedlichen Ionenstärken bedingt sind, wurde der Einfluß der Ionenstärke auf die Sedimentationskonstante der L.curvatus L-LDH bei pH 7,4 durch Bestimmung der $s_{20,w}^C$ -Werte bei den Ionenstärken von $I = 0,005$ und $I = 0,05$ geprüft. Diese Ionenstärken entsprachen ungefähr den Grenzwerten der in Tab. 6 aufgeführten Bedingungen, wobei die höhere etwa derjenigen bei Zugabe von 10 mM MnSO_4 entsprach.

Die Erhöhung der Ionenstärke von $I = 0,005$ auf $I = 0,05$ durch Zusatz von NaCl in Abwesenheit der Effektoren ergab nur eine leichte Veränderung des $s_{20,w}^C$ -Wertes von 2,64 auf 2,9 S. Dies bedeutet aber, daß die bei Zugabe von Mn^{2+} und die bei Veränderung der pH-Werte beobachteten starken Effekte nicht auf eine unspezifische Wirkung der Ionenstärke, sondern auf einen spezifischen Einfluß dieser beiden Faktoren auf die Quartärstruktur der L.curvatus L-LDH zurückzuführen sind.

Die durch 3 mM FDP bewirkte geringfügige Steigerung des $s_{20,w}^C$ -Wertes von 2,64 S auf 2,9 S (Tab. 6) entspricht dem bei Erhöhung der Ionenstärke auf $I = 0,05$ feststellbaren Effekt. Durch die Zugabe von FDP wird jedoch nur eine Ionenstärke von ca. $0,025$ erreicht, so daß sie als Ursache für diese Veränderung höchstens teilweise in Betracht kommt. Möglicherweise beruht der Einfluß des FDP auf einem spezifischen Verdichtungseffekt auf die Tertiärstruktur, ähnlich dem von Bartholmes et al. (1973) bei der Schwein H_4 L-LDH bei Zugabe von NADH beschriebenen.

Bemerkenswert ist im Fall der L.curvatus L-LDH, daß zwischen den Extremwerten von $s_{20,w}^C = 7,1 \text{ S}$ für das Tetramer und $s_{20,w}^C = 2,64 \text{ S}$ für das Monomer mehrere Zwischenwerte existieren ($3,5 \text{ S}$; $3,95 \text{ S}$; $4,6 \text{ S}$). Auch unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der pH-Wert sowie die Effektoren Mn^{2+} und FDP die Größe des $s_{20,w}^C$ -Wertes durch Veränderung des Hydratationszustandes und der Tertiärstruktur beeinflussen, lassen sich diese Zwischenwerte aufgrund ihrer Anzahl und Größenordnung nicht eindeutig den anderen noch möglichen Quartärzuständen nämlich der dimeren und trimeren Form zuordnen. Einer dimeren Form kommt zwar eine Sedimentationskonstante von $3,95 \text{ S}$ durchaus nahe, jedoch liegt der Wert von $4,6 \text{ S}$ für eine trimere Form auch unter der Annahme

einer linearen Anordnung der Untereinheiten etwas zu niedrig. Der $s_{20,w}^C$ -Wert von 3,5 S ist schließlich mit keiner denkbaren Quartärstruktur vergleichbar. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß unter den entsprechenden Bedingungen verschiedene Quartärstrukturen miteinander im Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht stehen, so daß die $s_{20,w}^C$ -Werte als Durchschnittswerte von je nach Bedingung unterschiedlichen Anteilen bestimmter Quartärformen aufzufassen sind. Für ein schnelles Einstellen des Gleichgewichtes spricht die Tatsache, daß aus den Kurven der Dichteverteilung (UV-Scannerkurven) während des Sedimentationsvorganges keine konkreten Anzeichen für das Vorliegen verschieden schnell sedimentierender Partikel zu erkennen waren (Abb. 15: dokumentiert für die L.curvatus L-LDH bei pH 7,0), wie es zu erwarten wäre, wenn verschiedene Quartärformen wie z.B. Monomere (2,64 S) und Tetramere (ca. 7 S) in einem sich langsam einstellenden Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht stehen.



Abb. 15: Konzentrationsprofil der L.curvatus L-LDH (3,5 S; 80-stündige Dialyse bei pH 7,0) während der Sedimentation bei 48 000 UPM und 20°C. UV-Scanner nach a) 40 min, b) 64 min. Die unteren Kurven entsprechen der 1. Ableitung der oben dargestellten Dichteverteilung. E = Extinktion; r = Abstand vom Rotormittelpunkt.

2.2 Denaturierung und Renaturierung der L-LDH-asen von L.curvatus, L.casei, L.acidophilus und L.plantarum

Die Dissoziation der L.curvatus und L.casei L-LDH bei pH 7,4 bzw. pH 9,2 ist mit einem völligen Aktivitätsverlust verbunden. Eine Inaktivierung war auch nach 30-minütiger Inkubation bzw. nach 15-stündiger Dialyse bei pH 7,8 (L.curvatus) bzw. pH 8,8 (L.casei, L.curvatus) festzustellen; wobei die L.casei L-LDH in beiden Fällen noch eine Restaktivität von 10-15 % aufwies. Demgegenüber bewirkte eine mehrstündige Inkubation der L-LDH-asen von L.plantarum und L.acidophilus bei pH 8,5 nur einen geringfügigen Aktivitätsverlust und damit wohl auch keine Dissoziation. Erst durch die Zugabe von 8 M Harnstoff bzw. 6,6 M Harnstoff konnte die L-LDH von L.acidophilus bzw. L.plantarum bei pH 8,5 inaktiviert werden. Nach einer ca. 50-minütigen Inkubationszeit wies das L.plantarum Enzym noch etwa 10 % Restaktivität auf, während die L.acidophilus L-LDH vollständig inaktiv war. Da Harnstoff als starkes denaturierendes und dissoziierendes Agens bekannt ist (Stellwagen und Schachmann, 1962; Chilson et al., 1964, 1965; Appella und Markert, 1961), kann dieser Aktivitätsverlust als Anzeichen für eine Dissoziation gewertet werden. Entsprechend der großen pH-Labilität der L.curvatus und L.casei L-LDH bewirkte bei diesen die Zugabe von 6,6 M Harnstoff schon bei pH 6,5 eine weitgehende (L.casei: 90-95 %ige) bzw. vollständige Inaktivierung (L.curvatus).

Die 4 L-LDH-asen waren in verschiedenem Ausmaß reaktiverbar. Im Fall der Harnstoffdenaturierung wurde der Harnstoff entweder durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer (10 mM Imidazol pH 6,5 plus Effektoren) entfernt oder durch 9-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3 unter Zusatz der Effektoren unwirksam gemacht. Nach Dissoziation im Basischen wurde die Reaktivierung durch Verschiebung des pH-Wertes auf pH 6,5 (konzentrierte Puffer) und Zugabe der Effektoren durchgeführt. Eine Übersicht über die Abhängigkeit der Reaktivierung von der Denaturierungs- und Reaktivierungsmethode gibt Tab. 7.

Tabelle 7: Reaktivierungsgrad der L-LDH-Asen von L.curvatus, L.casei, L.acidophilus und L.plantarum in Abhängigkeit von den De- und Renaturierungsbedingungen.

Denaturierung	Renaturierung	Proteinkonz. bei Reaktivierung	Herkunft der L-LDH	Reaktivierungsgrad (% Ausgangsaktivität)
Harnstoff	Dialyse gegen Reaktivierungspuffer	0,2 mg/ml	L.plantarum	34
"	"	0,2 mg/ml	L.acidophilus	85
"	"	0,2 mg/ml	L.casei	65-70
"	"	0,2 mg/ml	L.curvatus	60
Harnstoff	Verdünnen	19-77 µg/ml	L.casei	55-60
Harnstoff	Verdünnen	19-77 µg/ml	L.curvatus	75-80
Dialyse bei pH 8,8	schneller Wechsel auf pH 6,5 plus Effektoren	0,18 mg/ml	L.casei	60-65
" " "	"	0,18 mg/ml	L.curvatus	95
Dialyse bei pH 7,8	"	0,18 mg/ml	L.curvatus	100
Verdünnen bei pH 8,8	"	ca. 0,1 mg/ml	L.casei	60
Verdünnen bei pH 7,8	"	ca. 0,1 mg/ml	L.curvatus	100

Im Fall der *L.casei* L-LDH konnte der für die Reaktivierung durch Verdünnen nach Inkubation in Harnstoff angegebene Wert weder durch Zugabe von DTE (1 mM) zum Denaturierungs- und Renaturierungsgemisch noch durch die Veränderung der Temperatur bei der Denaturierung und (oder) Renaturierung zwischen 4 und 40°C verbessert werden. Auch die Zugabe verschiedener Mn^{2+} und FDP Konzentrationen oder von NADH (0,5 mM) ergab, wie auch im Fall der *L.curvatus* L-LDH, keine Verbesserung. Zusatz von 0,5 mM NADH bzw. 0,5 mM NADH plus 1 mM Pyruvat oder Pyruvat allein (1 mM) zum Reaktivierungspuffer (Reaktivierung durch Dialyse nach Harnstoffdenaturierung) blieb bei allen 4 L-LDH-asen wirkungslos. Demgegenüber konnte bei verschiedenen anderen L-LDH-asen der Reaktivierungsgrad durch NADH erhöht werden (Chilson et al., 1965; Teipel und Koshland, 1971).

Wie aus der Tab. 7 zu ersehen ist, sind die 4 L-LDH-asen nach Denaturierung mit Harnstoff durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer in unterschiedlichem Ausmaß reaktivierbar. Mit 85 % Reaktivierung liegt die *L.acidophilus* L-LDH deutlich höher als die *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH mit ca. 65 % oder die *L.plan-tarium* L-LDH mit nur 34 % Reaktivierung.

Beim *L.curvatus* Enzym ist allerdings nach Denaturierung durch Harnstoff und anschließende Reaktivierung durch Verdünnen eine Verbesserung der Reaktivierung auf 75-80 % zu erreichen, und nach Denaturierung durch Dissoziation im Alkalischen ist durch schnellen Wechsel auf Renaturierungsbedingungen eine Reaktivierung bis auf 100 % der Ausgangsaktivität möglich. Bei der *L.casei* L-LDH bleibt die Änderung der De- bzw. Renaturierungsmethode praktisch ohne Einfluß auf die Reaktivierbarkeit.

2.3 Reaktionsordnung der Reaktivierung der L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei*

2.3.1 Nach basischer Denaturierung

Die Kinetik der Reaktivierung der L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei* nach basischer Denaturierung wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,18 mg/ml bestimmt (Abb. 16).

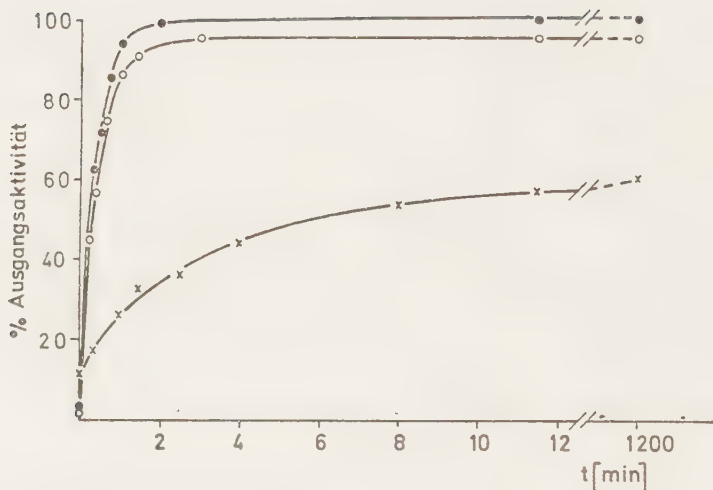


Abb. 16: Reaktivierung der L.curvatus und L.casei L-LDH nach Denaturierung durch 15-stündige Dialyse bei pH 8,8 (15 mM Imidazol; pH-Wert mit 1 N NaOH eingestellt) sowie der L.curvatus L-LDH nach 15-stündiger Dialyse bei pH 7,8 (15 mM Imidazolpuffer). Die Reaktivierung wurde durch Verschiebung des pH-Wertes auf ca. pH 6,5 (2,5-faches Verdünnen mit 80 mM Imidazolpuffer pH 6,3) und Zugabe von 6 mM Mn^{2+} und 1 mM FDP eingeleitet. Die Proteinkonzentration im Reaktivierungsansatz betrug 0,18 mg/ml.

- — ● L.curvatus Enzym denaturiert bei pH 7,8
- — ○ L.curvatus Enzym denaturiert bei pH 8,8
- x — x L.casei Enzym denaturiert bei pH 8,8

Bei beiden L-LDH-asen ergibt die halblogarithmische Auftragung der prozentualen Abnahme an reaktivierbarem Enzym gegen die Zeit eine Gerade (Abb. 17). Der Rekonstitution der aktiven Form liegt demnach eine Reaktion 1. Ordnung zugrunde, wobei vermutlich ein Umfaltungsprozeß den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Die beiden Enzyme unterscheiden sich allerdings sehr deutlich in ihrer Reaktivierungsgeschwindigkeit. Mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 2,3$ min reaktiviert die L.casei L-LDH nach Denaturierung bei pH 8,8 wesentlich langsamer als die L.curvatus

L-LDH mit Halbwertszeiten von $t_{1/2} = 22$ s bzw. 17. s nach Denaturierung bei pH 8,8 bzw. 7,8.

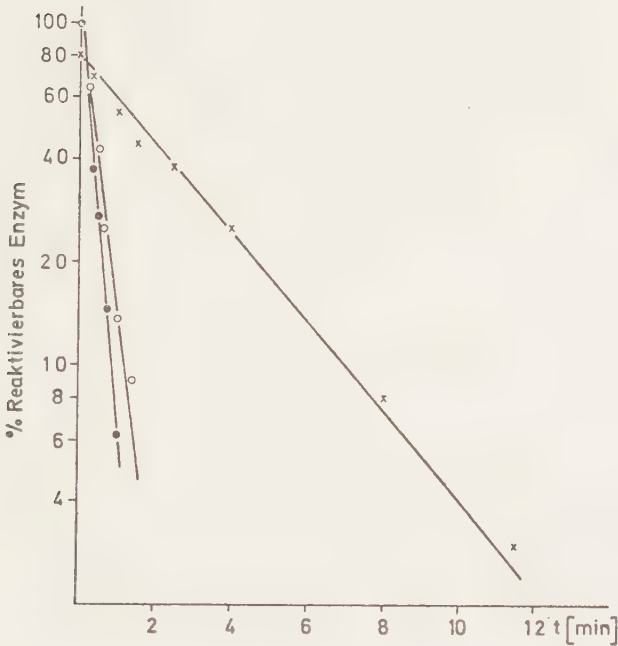


Abb. 17: Halblogarithmische Auftragung der in Abb. 16 dargestellten Reaktivierung der L.casei und L.curvatus L-LDH nach Denaturierung im Basischen, dargestellt als prozentuale Abnahme an reaktivierbarem Enzym (die maximale Reaktivierbarkeit wurde 100 % gesetzt).

- — L.curvatus L-LDH denaturiert bei pH 7,8;
 $t_{1/2} = 17$ s
- — L.curvatus L-LDH denaturiert bei pH 8,8;
 $t_{1/2} = 22$ s
- x — L.casei L-LDH denaturiert bei pH 8,8;
 $t_{1/2} = 2,3$ min

2.3.2 Nach Harnstoffdenaturierung

Im Gegensatz zur Reaktivierung nach basischer Denaturierung zeigt die Kinetik der Reaktivierung durch Verdünnen im Anschluß an eine Harnstoffdenaturierung einen sigmoiden Verlauf (Abb.18).

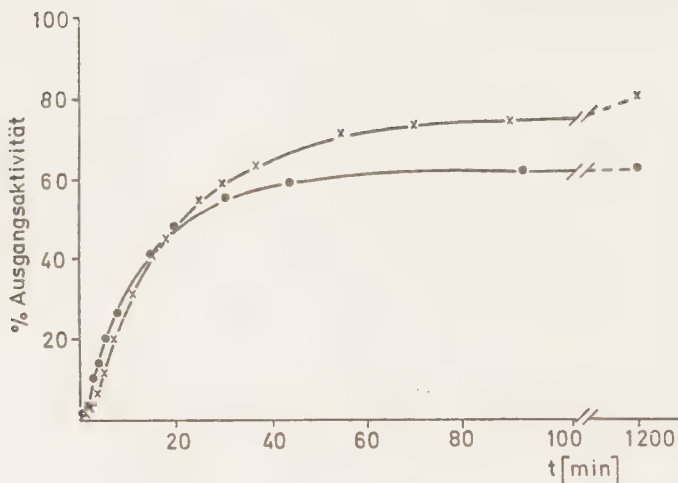


Abb. 18: Reaktivierung der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH nach Denaturierung durch 15-minütige Inkubation mit 6,6 M Harnstoff bei pH 7,0 (20 mM Imidazolpuffer). Die Reaktivierung wurde durch 9-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3 und Zusatz von 6 mM Mn^{2+} und 1 mM FDP eingeleitet. Die Proteinkonzentration im Reaktivierungsansatz betrug 0,077 mg/ml.

x — x *L.curvatus* L-LDH
 • — • *L.casei* L-LDH

Bei der halblogarithmischen Auftragung der prozentualen Abnahme an reaktivierbarem Enzym gegen die Zeit (Abb. 19) ergibt sich nach einer kurzen anfänglichen lag-Phase über ein größeres Zeitintervall eine Gerade. Im Fall der *L.curvatus* L-LDH weicht die Kurve gegen Ende der Reaktivierung wieder deutlich von einer Geraden ab, während dies bei der *L.casei* L-LDH nur als Tendenz angedeutet ist. Veränderungen der Proteinkonzentration im Reaktivierungsansatz (19 μ g/ml-77 μ g/ml) konnten weder diesen Reaktivierungsverlauf noch die Halbwertszeiten der Reaktivierung beeinflussen (für die log. Reaktivierungsphase:

$t_{1/2}$ *L.casei* = 8-10 min; $t_{1/2}$ *L.curvatus* = 11-14 min). Dies spricht dafür, daß der wesentliche Teil der Reaktivierung auch hier durch eine Reaktion 1. Ordnung bestimmt wird.

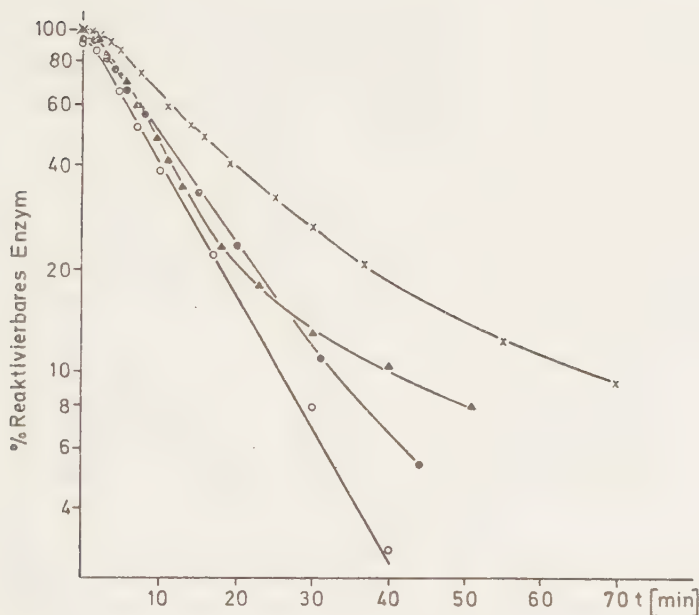


Abb. 19: Halblogarithmische Auftragung der Reaktivierungskinetik der L.casei und L.curvatus L-LDH in An- und Abwesenheit von 0,5 mM NADH, dargestellt als prozentuale Abnahme an reaktivierbarem Enzym (die maximale Reaktivierbarkeit wurde 100 % gesetzt). Die Denaturierung und Reaktivierung wurde wie zu Abb. 18 beschrieben durchgeführt. Der Reaktivierungsgrad wurde nach 20 Stunden bestimmt. Die Proteinkonzentration bei der Reaktivierung betrug 0,077 mg/ml.

x — x L.curvatus : -NADH; $t_{1/2} = 13,6$ min
 ▲ — ▲ L.curvatus : + NADH; $t_{1/2} = 7,5$ min
 ● — ● L.casei : - NADH; $t_{1/2} = 9,5$ min
 o — o L.casei : + NADH; $t_{1/2} = 7,8$ min

Niedrigere Enzymkonzentrationen, bei denen eine Assoziationsreaktion geschwindigkeitsbestimmend sein könnte und daher den Übergang zu einer höheren Reaktionsordnung zeigen könnte, konnten nicht untersucht werden, da die beiden L-LDH-Asen trotz Vorhandensein von Mn^{2+} und FDP bei Konzentrationen unter 10 $\mu\text{g/ml}$ Protein (L.curvatus) bzw. 4 $\mu\text{g/ml}$ (L.casei) inaktiv werden.

Die kurze lag-Phase zu Beginn der Renaturierung könnte dadurch bedingt sein, daß dem relativ langsamen Umfaltungsprozeß noch ein sehr schnell verlaufender Renaturierungsprozeß (eine Umfaltungsreaktion 1. Ordnung) vorgelagert ist. Diese Reaktion würde sozusagen das Substrat für den folgenden langsamen Reaktionsschritt liefern.

Derartige, der gemessenen Reaktivierung vorgelagerte, schnelle Umfaltungsprozesse konnten durch Fluoreszenz- und ORD-Messungen schon verschiedentlich nachgewiesen werden (Levitzki, 1976; Teipel und Koshland, 1971).

Eine weitere Ursache für diese lag-Phase könnte die geringe Konzentration an assoziierbaren Formen zu Beginn der Reaktivierung sein. Ihre Assoziierung wäre dann geschwindigkeitsbestimmend, und es ergäbe sich eine Reaktion höherer Ordnung. Durch die Zunahme dieser Einheiten im weiteren Reaktionsverlauf stiege die Reaktionsgeschwindigkeit dann aber so an, daß der konzentrationsunabhängige Umfaltungsprozeß (Reaktion 1. Ordnung) geschwindigkeitsbestimmend wird. Allerdings sollte in diesem Fall die Erhöhung der Proteinkonzentration im Renaturierungsansatz zur Verkürzung der lag-Phase führen. Die in der Abb. 20 dargestellten Kurven für die Proteinkonzentration von 19 $\mu\text{g/ml}$ und 77 $\mu\text{g/ml}$ zeigen jedoch praktisch gleiche Verzögerungsphasen.

Der Übergang in eine langsamere Reaktivierungsphase gegen Ende der Reaktivierung bei der L.curvatus L-LDH war von der eingesetzten Proteinkonzentration völlig unabhängig und setzte bei allen getesteten Konzentrationen beim gleichen Prozentsatz der Reaktivierung ein (Abb. 20; nur für die höchste und niedrigste Konzentration dargestellt). Daher scheint es unwahrscheinlich, daß durch die Abnahme an assoziierbaren Intermediärprodukten gegen Reaktionsende eine Assoziierungsreaktion geschwindigkeitsbestimmend wird (Reaktion höherer Ordnung) und das Abweichen von der Geraden verursacht. Die Abweichung ließe sich jedoch durch die Annahme erklären, daß die L.curvatus L-LDH zu Beginn der Reaktivierung in qualitativ verschiedenen Denaturierungszuständen

unterschiedlich schneller Reaktivierbarkeit vorliegt, so daß in der Schlußphase der Reaktivierung die Umfaltung der stärker denaturierten Anteile geschwindigkeitsbestimmend wird. Dafür spricht auch der Befund, daß bei Präparationen, die länger denaturiert wurden (50 Minuten), ein frühzeitigeres Abweichen aus der logarithmischen Reaktivierungsphase zu beobachten ist (Abb. 20), wie es einem größeren Anteil an stärker denaturiertem Enzym entspricht.

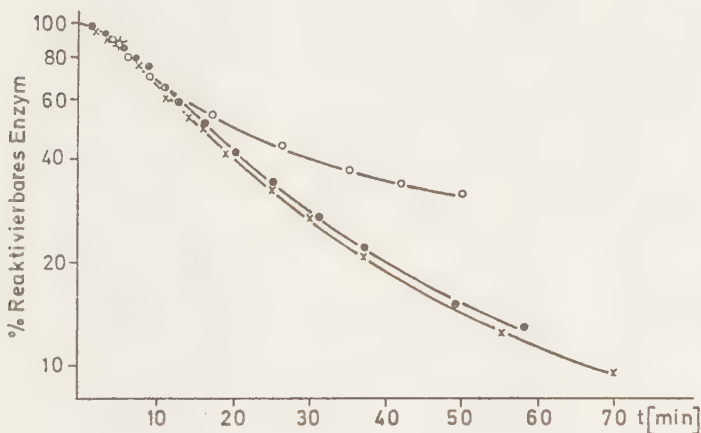


Abb. 20: Einfluß der Proteinkonzentration und Denaturierungsdauer (6,6 M Harnstoff; 20 mM Imidazolpuffer pH 7,0) auf die Reaktivierung der L-curvatus L-LDH (maximale Reaktivierung = 100 %).
Proteinkonzentration bei der Denaturierung: 0,7 mg/ml.
Reaktivierung: 9- bzw. 36-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3 und Zugabe von 6 mM Mn^{2+} und 1 mM FDP; Bestimmung des Reaktivierungsgrades nach 20 Stunden.

x — x 15 min denat.; 0,077 mg/ml bei der Reaktivierung
o — o 50 min denat.; 0,077 mg/ml bei der Reaktivierung
• — • 15 min denat.; 0,019 mg/ml bei der Reaktivierung

2.3.3 Einfluß von NADH auf die Reaktivierungsgeschwindigkeit der L-curvatus und L.casei L-LDH nach Harnstoffdenaturierung

Obwohl NADH auf das Ausmaß der Reaktivierbarkeit nach Harnstoffinaktivierung keinen Einfluß hat, erhöht es bei Verwendung in einer 0,5 mM Konzentration die Reaktivierungsgeschwindigkeit,

wobei die Wirkung auf die L.curvatus L-LDH mit einer Verdoppelung der Reaktivierungsgeschwindigkeit (Abb. 19) ausgeprägter ist als die Wirkung auf die L.casei L-LDH. Weder die lag-Phase noch das Abweichen der L.curvatus L-LDH aus der logarithmischen Reaktivierungsphase konnten durch NADH aufgehoben werden.

2.4 Hybridisierungsversuche zwischen den L-LDH-asen von L.curvatus, L.casei, L.plantarum und L.acidophilus

Hybridisierungsversuche zwischen den 4 L-LDH-asen wurden durch Mischen jeweils gleicher Mengen zweier mit Harnstoff denaturierter L-LDH-asen und anschließende Reaktivierung durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer durchgeführt. Nur bei dieser Technik reagierten alle 4 Enzyme in ähnlicher Weise, d.h. zunächst 90-100 %iger Aktivitätsverlust und - abgesehen von der L.plantarum L-LDH - vergleichbar hohe Reaktivierbarkeit (Tab. 7). Zur Hybridisierung wurden folgende Kombinationen verwendet: L.casei - L.curvatus; L.casei - L.plantarum; L.curvatus - L.acidophilus. Die rekonstituierten Gemische wurden durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 mit und ohne Zusatz der Effektoren Mn^{2+} und FDP aufgetrennt. Wegen der geringen Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit der tetrameren Formen der L-LDH-asen von L.casei und L.acidophilus einerseits und der von L.curvatus und L.plantarum andererseits wurden diese Kombinationen für Hybridisierungen nicht untersucht.

2.4.1 Hybridisierung der L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei

Aufgrund statistischer Überlegungen sind bei der zufälligen Rekombination der Untereinheiten der beiden tetrameren L-LDH-asen fünf Enzymformen und damit fünf Banden zu erwarten. Diese Banden sollten die beiden Ausgangsenzyme in folgender Zusammensetzung enthalten:

Bande 1: L.casei	= ca_4
Bande 2: L.casei : L.curvatus = 3 : 1	= ca_3cu_1
Bande 3: L.casei : L.curvatus = 2 : 2	= ca_2cu_2
Bande 4: L.casei : L.curvatus = 1 : 3	= ca_1cu_3
Bande 5: L.curvatus	= cu_4

Entgegen der Erwartung konnten nach der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 ohne Effektoren durch Proteinfärbung 4 Banden und durch Aktivitätsnachweis 6 Banden - davon 2 Banden nur sehr schwach - sichtbar gemacht werden (Abb. 21).

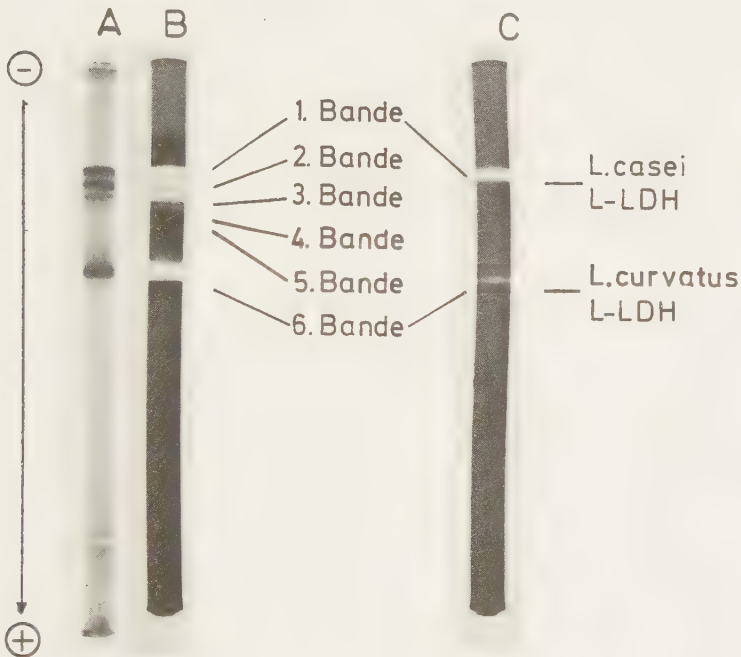


Abb. 21: Elektropherogramm eines bei pH 7,5 ohne Effektoren elektrophoretisch aufgetrennten *L.curvatus*-*L.casei* Hybridisierungsansatzes. Die beiden Enzyme wurden in einer Konzentration von je 0,2 mg/ml mit 6,6 M Harnstoff bei pH 7,0 (20 mM Imidazolpuffer) denaturiert. Nach Mischung gleicher Mengen wurde die Renaturierung durch Dialyse bei pH 6,5 (10 mM Imidazolpuffer plus 6 mM Mn^{2+} plus 1 mM FDP) eingeleitet.

A) Lokalisierung des Proteins B) Lokalisierung der Aktivität C) Lokalisierung der Aktivität von gleichermaßen behandelten, aber erst vor der Elektrophorese gemischter *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH.

Die Wanderungsstrecke der obersten Bande entsprach reiner L.casei L-LDH, die der untersten Bande reiner L.curvatus L-LDH. Inwieweit es sich bei den anderen Banden um Hybridbildungen handelte, wurde durch die Analyse der Banden überprüft. Dazu wurden die nach Inkubation mit NADH und Pyruvat unter UV-Licht sichtbaren Enzymbanden ausgeschnitten und einer Reelektrophorese auf einem Polyacrylamid-Harnstoff (8 M)-Gel bei pH 8,7 unterzogen. Dabei sollten die tetrameren Formen in Monomere dissoziieren. Da die L.curvatus und L.casei L-LDH Monomeren entsprechend ihrem unterschiedlichen I.P. (Hensel, 1977) eine verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen, werden ihre in den Hybridbanden enthaltenen Anteile voneinander getrennt und können nach Anfärbung der Proteinbanden densitometrisch bestimmt werden.

Tatsächlich wurde für die 2. Bande (Abb. 21) ein der Erwartung (L.casei : L.curvatus = 3:1) entsprechendes Verhältnis der Proteinanteile von L.casei : L.curvatus = 3,14:1 gefunden. Diese Bande entspricht also der Hybridform ca_3cu_1 . Die Banden 3, 4 und 5 wurden gemeinsam ausgeschnitten und analysiert, da sie, besonders die beiden letzteren, nur sehr schwach ausgebildet waren. Entgegen dem hier zu erwartenden Überwiegen der L.curvatus L-LDH - in der 3. Bande sollten die beiden Enzyme in gleichen Anteilen vorliegen (ca_2cu_2), während in der 4. Bande die L.curvatus L-LDH dominieren (ca_1cu_3) und die 5. Bande ausschließlich aus ihr bestehen sollte (cu_4) - war ihr Anteil jedoch wesentlich geringer als der des L.casei Enzyms. Außerdem waren noch geringe Mengen an L.curvatus L-LDH im Bereich zwischen der 5. und 6. Bande diffus vorhanden.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Sedimentationsexperimente lag die Vermutung nahe, daß eine Hybridisierung zwar erfolgt war, die L.curvatus L-LDH Anteile der Banden 3, 4 und 5 (ca_2cu_2 ; ca_1cu_3 ; cu_4) in dem verwendeten Gelsystem von pH 7,5 während der Elektrophorese jedoch abdissoziieren und als Monomere, vielleicht auch als Dimere die Bande 6 bilden. Möglicherweise stellen also die 3. und 4. Bande noch den L.casei Anteil der ursprünglichen ca_2cu_2 und ca_1cu_3 Hybride dar, während die 5. Bande als Rest der ursprünglichen L.curvatus L-LDH Tetrameren aufgefaßt werden könnte.

Da die Effektoren die Dissoziation der *L.curvatus* L-LDH verhindern, wurden in einem weiteren Versuch die Hybridgemische durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 unter Zusatz der beiden Effektoren aufgetrennt. Sowohl durch Proteinfärbung als auch durch Aktivitätsnachweis konnten wiederum 6 Banden nachgewiesen werden (Abb. 22).

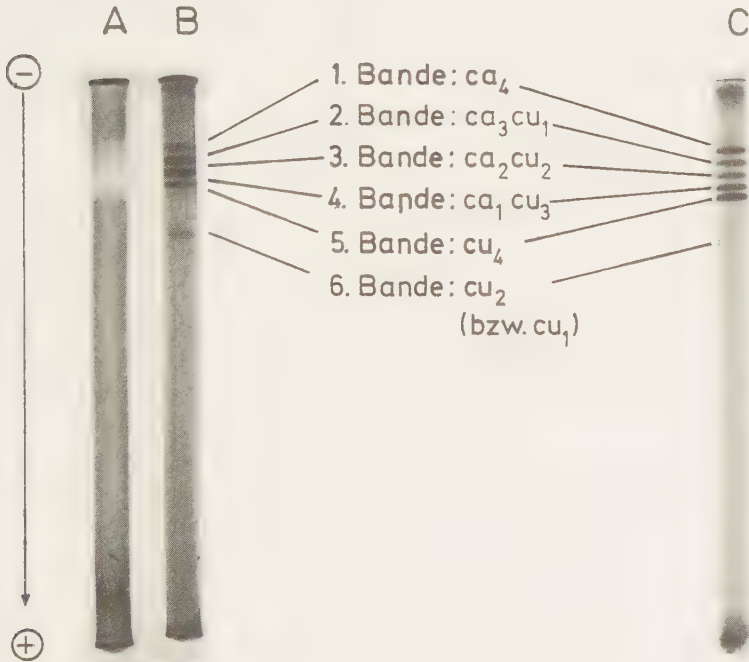


Abb. 22: Elektropherogramm von *L.curvatus*-*L.casei* Hybridisierungsansätzen, die bei pH 7,5 in Gegenwart von 1 mM Mn^{2+} und 0,1 mM FDP elektrophoretisch aufgetrennt wurden. A,B: Die Hybridisierung wurde wie zu Abb. 21 beschrieben durchgeführt. A) Lokalisierung der Aktivität B) Lokalisierung des Proteins. C: Hybridisierung nach Dissoziation des *L.curvatus* Enzyms durch 15-stündige Dialyse bei pH 7,8 (15 mM Imidazolpuffer) bzw. des *L.casei* Enzyms bei pH 8,8 (15 mM Imidazol, pH-Wert mit 1 N NaOH eingestellt). Die Mischung gleicher Mengen der in einer Konzentration von 0,45 mg/ml vorliegenden Enzyme erfolgte unmittelbar nach Umstellen der *L.casei* L-LDH auf ca. pH 6,5 (Zugabe einer adäquaten Menge an 1 M Acetatpuffer pH 4,8) und Zusatz von 6 mM Mn^{2+} und 0,1 mM FDP. Es wurden die Proteinbanden angefärbt.

In Abb. 22 (A) ist die 6. Bande wegen der zu kurzen Entwicklungszeit allerdings noch nicht erkennbar. Ihre volle Aktivität ist erst dann entwickelt, wenn die Entwicklung der übrigen Banden schon soweit fortgeschritten ist, daß sie nicht mehr unterscheidbar sind.

Die Analyse der Banden durch Harnstoff-Gel-Elektrophorese bei pH 8,7 ergab folgende Zusammensetzung (Abb. 22 von oben nach unten):

Bande 1: L.casei

Bande 2: L.casei : L.curvatus = 3,2 : 1

Bande 3: L.casei : L.curvatus = 2 : 1,8

Bande 4: L.casei : L.curvatus = 0,81 : 3

Bande 5: L.curvatus

Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte von je 3 Parallelproben. Diese Ergebnisse entsprechen praktisch den zuvor aufgeführten theoretisch zu erwartenden Verhältnissen. Neben den homomeren Formen ca_4 (1. Bande) und cu_4 (5. Bande) wurden tatsächlich die Hybride ca_3cu_1 , ca_2cu_2 und ca_1cu_3 gefunden. Die unterste Bande der Abb. 22 stellt ebenfalls eine reine L.curvatus Bande dar. Da sie auch bei der Elektrophorese des nicht denaturierten Enzyms auftrat, ist sie wohl auf eine teilweise Instabilität der L.curvatus L-LDH (cu_4) bei den verwendeten relativ niedrigen Mn^{2+} (1 mM)- und FDP (0,1 mM)-Konzentrationen zurückzuführen. Sie könnte als L.curvatus Dimer (cu_2) oder Monomer (cu_1) aufgefaßt werden. Ihr Anteil läßt sich herabsetzen, wenn durch häufigeren Wechsel der Kammerpuffer während der Elektrophorese eine Verarmung an Effektoren vermieden wird.

2.4.2 Hybridisierung der L-LDH-asen von: L.curvatus - L.acidophilus; L.casei - L.plantarum

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Hybridisierungsgemische L.casei - L.plantarum und L.curvatus - L.acidophilus konnten weder durch Proteinfärbung noch durch Aktivitätsnachweis Hybridbanden nachgewiesen werden. Um sicher zu stellen, daß das L.acidophilus Enzym bei der angegebenen Denaturierungsmethode tatsächlich dissoziierte, wurden die L-LDH-asen von L.acidophilus, L.curvatus und L.casei einer Elektrophorese im 8 M Harnstoffgel bei pH 8,7 unterzogen, bei Bedingungen also, die mit der Denaturierungsmethode des L.acidophilus Enzyms fast identisch sind und bei denen die L.curvatus und L.casei L-LDH mit Sicherheit als Monomere vorliegen. Die elektrophoretische Beweglichkeit nimmt dabei in Übereinstimmung mit ihrem I.P. (Hensel, 1977) in der Reihenfolge: L.curvatus > L.acidophilus > L.casei ab.

Unter denselben Elektrophoresebedingungen, aber ohne Harnstoff, bei denen die L.curvatus und L.casei L-LDH ebenfalls als Monomere vorliegen, die L.acidophilus L-LDH aber wahrscheinlich als Tetramer, ist die Reihenfolge: L.curvatus > L.casei > L.acidophilus.

Der Harnstoffzusatz vergrößert also die elektrophoretische Beweglichkeit der L.acidophilus L-LDH gegenüber den L.casei L-LDH-Monomeren. Hieraus kann man schließen, daß unter dem Einfluß von Harnstoff das L.acidophilus Enzym tatsächlich in Untereinheiten dissoziierte und das oben beschriebene negative Hybridisierungsergebnis die Inkompatibilität der beiden L-LDH-asen anzeigt.

2.5 Stabilität der L.curvatus - L.casei homo- und heteromeren L-LDH-Formen

Zur Überprüfung der Stabilität der verschiedenen L-LDH-Formen wurden die durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 mit Zusatz von Mn^{2+} und FDP aus dem L.curvatus - L.casei Hybridisierungsgemisch erhaltenen Banden ausgeschnitten und erneut der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 mit und ohne Effektoren unterzogen. Eine schematische Darstellung der Ergebnisse gibt Abb. 23.

L.casei - L.curvatus
Hybridgemisch

elektrophoretische
Auftrennung bei
pH 7,5 unter Zusatz
der Effektoren

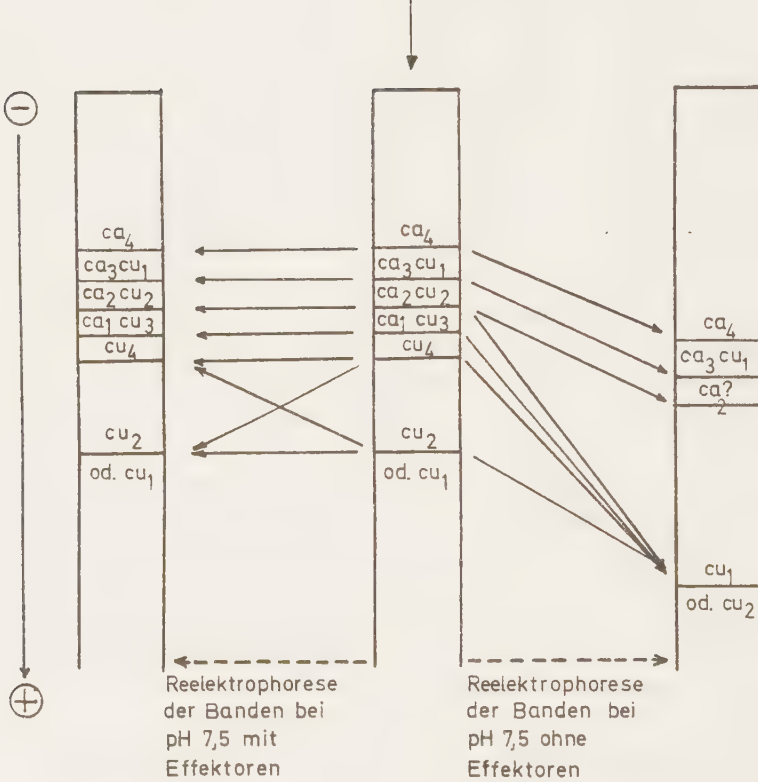


Abb. 23: Stabilität der L.curvatus - L.casei homo- und heteromeren L-LDH-Formen bei der Reoelektrophorese im Polyacrylamid-Gel bei pH 7,5 mit und ohne Effektoren.

Die Banden 1-4 (ca_4 , ca_3cu_1 , ca_2cu_2 , ca_1cu_3 ; Abb. 22) erwiesen sich als stabil und nahmen bei der Reelektrophorese bei pH 7,5 mit Effektoren wieder die gleichen Positionen ein. Die Banden 5 und 6 (ca_4 ; cu_2 oder cu_1) spalteten jeweils in 2 Banden auf, deren Positionen wiederum den Banden 5 und 6 (Abb. 22) entsprachen.

Nach Reelektrophorese bei pH 7,5 ohne Mn^{2+} und FDP ergab sich dagegen folgendes Bild: ca_4 und ca_3cu_1 blieben wiederum stabil und nahmen die in Abb. 21 als Bande 1 und 2 bezeichneten Positionen ein. Die Bande ca_2cu_2 spaltete in 2 Banden auf, wobei eine die Stelle der Bande 3, die andere die der Bande 6 (Abb. 21) einnahm. ca_1cu_3 ergab nur eine Bande, die der Bande 6 (Abb. 21) entsprach. Der L.casei Anteil von ca_1cu_3 war nicht mehr nachweisbar. cu_4 (Abb. 22, Bande 5) und die als cu_2 oder cu_1 anzusprechende 6. Bande (Abb. 22) ergab ebenfalls Bande 6 der Abb. 21. Dies zeigt, daß die Stabilität der verschiedenen L-LDH-Formen in Abwesenheit der Effektoren mit zunehmendem Anteil an L.curvatus L-LDH in den Tetrameren abnimmt.

2.6 Einfluß verschiedener Hybridisierungsmethoden auf die Mengenverteilung der L.curvatus - L.casei homo- und heteromeren L-LDH-Formen

Zur Hybridisierung der beiden L-LDH-asen wurden 3 verschiedene Methoden angewandt. 1.) Nach Dissoziation der beiden L-LDH-asen im Basischen und Mischen gleicher Mengen wurde durch Verschiebung des pH-Wertes auf pH 6,5 und Zusatz der Effektoren auf Reaktivierungsbedingungen umgestellt (5-stündige Reaktivierung). 2.) Nach Harnstoffdenaturierung wurden jeweils gleiche Enzymmengen vereinigt und die Mischungen durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer (40 Stunden) oder 3.) durch 9-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3 unter Zusatz der Effektoren reaktiviert (6 Stunden). Im letzterem Fall wurde ein Teil des reaktivierten Gemisches zusätzlich noch 10 Stunden gegen Reaktivierungspuffer dialysiert.

Die rekonstituierten Gemische wurden bei pH 7,5 in Anwesenheit von Mn^{2+} und FDP elektrophoretisch aufgetrennt. Aus den densitometrisch ausgewerteten Elektropherogrammen wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen L-LDH-Formen bestimmt, wobei die Summe der Banden gleich 100 % gesetzt wurde. Die dialysierte und nicht dialysierte Probe nach Anwendung der Hybridisierungsmethode (3) ergaben das gleiche Ergebnis.

Bei idealer Rekombination gleicher Mengen an *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH-Monomeren wäre folgende binomiale Verteilung der verschiedenen L-LDH-Formen zu erwarten:

$$ca_4 : ca_3cu_1 : ca_2cu_2 : ca_1cu_3 : cu_4 = 1 : 4 : 6 : 4 : 1 \triangleq \\ \triangleq 6,5 \% : 25 \% : 37 \% : 25 \% : 6,5 \%$$

Wie aus Tab. 8 hervorgeht, ergeben die 3 Methoden sehr unterschiedliche und vom idealen Verhältnis zum Teil stark abweichende Verteilungen. Als Ursache für diese Abweichungen kommen mehrere Faktoren in Betracht. Entsprechend der unterschiedlichen Reaktivierbarkeit der beiden Enzyme sind auch, trotz gleicher Gesamtzymmengen, die Anteile an rekombinierbaren *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH-Monomeren verschieden. Dies kommt sehr deutlich durch die Übereinstimmung des jeweils erreichbaren Reaktivierungsgrades (Tab. 7) der beiden L-LDH-asen und ihrer aus den Proteinbanden bestimmbaren Proteinanteile am Gesamtprotein zum Ausdruck (Tab. 8).

Auch der unterschiedliche Dissoziationsgrad nach der Denaturierung wirkt in dieser Richtung. So waren nach der basischen Denaturierung der *L.casei* L-LDH durch 15-stündige Dialyse noch 10 % - 15 % der Ausgangsaktivität vorhanden, und damit war wohl keine vollständige Dissoziation erreicht, während unter denselben Bedingungen die *L.curvatus* L-LDH keine Aktivität mehr zeigte. Außerdem sind die Reaktivierungsgeschwindigkeiten der Enzyme bei den hier verwendeten Methoden, besonders bei der Reaktivierung nach basischer Denaturierung, unterschiedlich.

Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der Rekombinanten nach Hybridisierung der L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei bei verschiedenen Bedingungen. Die Summe der nach elektrophoretischer Auftrennung erhaltenen Banden wurde 100 % gesetzt. Jeder Hybridisierungsansatz enthielt gleiche Mengen an L.curvatus und L.casei Enzym.

Hybridisierungsbedingungen	Protein-konzentration (mg/ml)	% Anteil der verschiedenen LDH-Formen					% Anteil am Gesamtprotein der Rekombinanten	
		ca ₄	ca ₃ cu ₁	ca ₂ cu ₂	ca ₁ cu ₃	cu ₄ +cu ₂ bzw. cu ₁	L ₁	L ₂ curvatus casei
Harnstoffdenaturierung, Renaturierung durch Dialyse (pH 6,5 plus Effektoren)	0,2	16,9	23,9	29,2	18,7	11,2	45,9	54,1
Harnstoffdenaturierung, Renaturierung durch Verdünnen	0,08	2,9	11,2	39,7	37,4	8,7	59,7	40,3
Denaturierung durch 15 Stunden Dialyse bei pH 7,8 (L.cu.) bzw. pH 8,8 (L.ca.), Renaturierung durch schnellen Wechsel auf pH 6,5 plus Effektoren	0,45	16,2	16,6	14,5	19,7	33	59,2	40,8

Aus dem Zusammenwirken dieser Faktoren läßt sich die stark abweichende Verteilung, wie sie bei Hybridisierung nach basischer Denaturierung und Reaktivierung durch Umstellen auf pH 6,5 unter Zusatz der Effektoren zu beobachten ist, wenigstens teilweise verstehen. So führt die unvollständige Dissoziation der L.casei L-LDH zu einem erhöhten Anteil an ca_4 . Der im Gegensatz zur L.casei L-LDH mit nur 65 % Reaktivierung wesentlich höhere Reaktivierungsgrad des L.curvatus Enzyms von 100 % läßt hingegen eine Bevorzugung von cu_4 und ca_1cu_3 erwarten. Außerdem reaktiviert die L.curvatus L-LDH etwa siebenmal schneller als die L.casei L-LDH. Auch dies sollte zunächst zu einer stark erhöhten Bildung von cu_4 und unter der Annahme einer ebenfalls schnelleren Bildung bzw. Weiterreaktion von ca_1cu_1 verglichen mit ca_2 auch zu einer Bevorzugung von ca_1cu_3 führen, da ca_1cu_1 nun eher mit cu_2 weiterreagiert als mit den langsamer entstehenden bzw. weiterreagierenden ca_2 oder mit sich selbst. Die wesentlich schnellere Abnahme an L.curvatus L-LDH Monomeren führt schließlich zu einem allmählichen Überwiegen an L.casei L-LDH Monomeren, so daß gegen Ende der Reaktion diejenigen Rekombinant-ten bevorzugt entstehen sollten, in denen die L.casei L-LDH überwiegt, also ca_4 und ca_3cu_1 , deren Anteil tatsächlich zu hoch ist. Durch diesen Rekombinationsverlauf würde sich der wesentlich zu niedrige Anteil an ca_2cu_2 verstehen lassen.

Eine den idealen Rekombinationsverhältnissen schon sehr nahe kommende Verteilung ist bei Hybridisierung nach Harnstoffdenaturierung und Reaktivierung durch Verdünnen feststellbar. Bei dieser Versuchsanordnung ist der Unterschied im Dissoziationsgrad der beiden Enzyme nur geringfügig, und ihre Reaktivierungsgeschwindigkeiten sind ziemlich ähnlich. Als einziger, das Rekombinationsverhältnis abweichend beeinflussender Faktor kommt der unterschiedliche Reaktivierungsgrad (Tab. 7) in Betracht. Das Verhältnis der reaktivierbaren Anteile läßt ein Verhältnis von L.casei : L.curvatus Monomeren von ca. 0,7 : 1 erwarten. Tatsächlich entspricht das Verhältnis der in den Banden enthaltenen Proteinanteile an L.casei und L.curvatus L-LDH von 40,3 % :

59,7 % ($\hat{=} 0,67 : 1$) der Erwartung. Dieses Mengenverhältnis führt bei idealer Rekombination zu einem Verhältnis von:
 $ca_4 : ca_3cu_1 : ca_2cu_2 : ca_1cu_3 : cu_4 = 1 : 5,6 : 12,2 : 11,6 : 4,2$,
dem die gefundene Verteilung (Tab. 8) entsprechend einem Verhältnis von $ca_4 : ca_3cu_1 : ca_2cu_2 : ca_1cu_3 : cu_4 + cu_2$ (bzw. cu_1) = $1 : 4 : 13,7 : 13 : 3$ auch sehr nahe kommt.

Demgegenüber entspricht die Verteilung der Hybridbanden nach Harnstoffdenaturierung und Reaktivierung durch Dialyse einem binomialen Verhältnis besser, aber die Anteile der homomeren Formen ca_4 und cu_4 liegen erheblich zu hoch. Auch in diesem Fall dürfte der Unterschied im Dissoziationsgrad nur gering sein. Die Reaktivierungsgeschwindigkeit der beiden Enzyme ist bei dieser Versuchsanordnung nicht meßbar, kann aber, entsprechend den Verhältnissen bei Reaktivierung durch Verdünnen, als ähnlich angenommen werden. Der bei dieser Methode etwas höhere Reaktivierungsgrad der L.casei L-LDH (Tab. 7) läßt eine bevorzugte Bildung von ca_4 und ca_3cu_1 erwarten, kann aber wohl nicht die sehr starke Entwicklung von ca_4 befriedigend erklären. Da auch cu_4 einen stark erhöhten Anteil aufweist, ist anzunehmen, daß bei diesen Hybridisierungsbedingungen die Affinität zwischen gleichen Untereinheiten größer ist als die zwischen verschiedenen.

Es wäre auch denkbar, daß die primäre Verteilung der Assoziationsprodukte aufgrund eines Dissoziations-Assoziationsgleichgewichtes nachträglich durch Austausch von Untereinheiten zwischen den verschiedenen L-LDH Formen verändert wird. Dies scheint aber aus folgenden Gründen unwahrscheinlich:

- a) Auch nach mehrstündiger Inkubation einer Mischung der nicht denaturierten L-LDH-asen bei den beschriebenen Reaktivierungsbedingungen konnten nach elektrophoretischer Auftrennung des Inkubationsgemisches keine Hybridformen nachgewiesen werden.
- b) Die Untersuchung der Mengenverteilung der Rekombinanten nach Hybridisierung der L.curvatus und L.casei L-LDH nach Harnstoffdenaturierung und Reaktivierung durch Verdünnen ergab nach 48 Stunden dieselben Werte wie nach 20 Stunden.

2.7 Hybridisierungsversuche zur Aufklärung der Quartärstruktur der L.curvatus L-LDH bei Bedingungen, die zu intermediären Sedimentationskonstanten führen

Wie aus den Ultrazentrifugationsstudien (Tab. 6) hervorgeht, ergeben sich für die $s_{20,w}^C$ -Werte der L.curvatus L-LDH im Bereich von pH 5,5 bis 7,4 Übergänge zwischen den für Tetramere und Monomere typischen Werten von 7,1 S und 2,64 S. Zwar liegt die Vermutung nahe, daß dies auf Gleichgewichte zwischen jeweils verschiedenen Anteilen bestimmter Spezies (n-Mere) zurückzuführen ist, doch geben die Sedimentationskonstanten keinen direkten Aufschluß über die Art der Assoziationszustände und deren mengenmäßige Anteile. Es besteht auch die Möglichkeit, daß der $s_{20,w}^C$ -Wert von 4,6 S bei pH 6,4 (ohne Effektoren) oder der von 3,95 S bei pH 7,4 in Gegenwart von 0,5 mM Mn^{2+} einer reinen dimeren Form der L.curvatus L-LDH entspricht, denn ein ähnlicher Wert (4,0 S) wurde von Lovell und Winzor (1974) für die dimere Form der Kaninchen M_4 L-LDH (Molekulargewicht: 74 000) gefunden. Auch für die D-LDH-asen von L.leichmannii und L.fermenti mit Molekulargewichten von 68 000 bzw. 80 000 (Gasser et al., 1970), wie es Dimeren entspricht, sind Sedimentationskonstanten von 3,9 S bzw. 4,4 S (Gasser et al., 1970) beschrieben.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine dissoziierte L.casei L-LDH (15-stündige Dialyse gegen pH 8,8) mit L.curvatus L-LDH hybridisiert, die unter Bedingungen vorbehandelt war, die zu den $s_{20,w}^C$ -Werten von 3,95 S (Probe II der Tab. 9: Dialyse gegen pH 7,4 mit Mn^{2+}) und 4,6 S (Probe III der Tab. 9: Dialyse gegen pH 6,4 ohne Effektoren) führten. Als Kontrolle wurde eine Hybridisierung mit derselben Präparation der L.casei L-LDH und einer vollständig denaturierten L.curvatus L-LDH (Probe I der Tab. 9: 15-stündige Dialyse gegen pH 7,8) durchgeführt. Die Mischung jeweils gleicher Mengen der in einer Konzentration von 0,45 mg/ml vorliegenden L-LDH-asen erfolgte unmittelbar nach Umstellen der L.casei L-LDH auf Reaktivierungsbedingungen (pH 6,5 plus Mn^{2+} plus FDP). Nach elektrophoretischer Auftrennung der reaktivierten Gemische nach 5-stündiger Inkubation wurde die prozentuale Verteilung der Proteinbanden bestimmt.

Wie aus der Tab. 9 hervorgeht, treten nach der Hybridisierung der L.casei L-LDH mit den unvollständig denaturierten Proben der L.curvatus L-LDH (Probe II und III) noch alle Hybridformen auf, jedoch ergeben sich im Vergleich zur Hybridisierung mit der vollständig denaturierten L.curvatus L-LDH (Probe I) deutliche Unterschiede in der Verteilung der einzelnen L-LDH-Formen. Während in der Kontrolle (Hybridisierung mit der Probe I) die Hybridformen ca_3cu_1 , ca_2cu_2 und ca_1cu_3 in annähernd gleicher Menge vorliegen, nimmt bei den Hybridisierungen der L.casei L-LDH mit den Proben II und III der Anteil an ca_2cu_2 , besonders aber an ca_1cu_3 , drastisch ab und damit auch der Anteil der L.curvatus L-LDH, der insgesamt in den Hybridbanden enthalten ist. Diese Ergebnisse können folgendermaßen interpretiert werden:

1.) Das Vorliegen von erheblichen Mengen an L.curvatus L-LDH Monomeren in den Proben II und III kommt durch die bei Hybridisierung mit diesen Proben stark auftretende Hybridform ca_3cu_1 zum Ausdruck. Wenn die L.curvatus L-LDH nur aus Dimeren bestanden hätte, wären nur die Banden ca_4 , cu_4 und ca_2cu_2 zu erwarten gewesen.

2.) Die hohe Ausbeute an cu_4 bei Hybridisierung mit den Proben II und III spricht dafür, daß in den Ausgangslösungen L.curvatus L-LDH Tetramere (cu_4) und möglicherweise Dimere (cu_2) vorgelegen haben. Da diese Dimeren in einem weniger denaturierten Zustand vorliegen als die zugegebenen L.casei L-LDH Monomeren, können sie von diesen wohl nicht durch Hybridbildung abgefangen werden, so daß sie zu cu_4 assoziieren.

3.) Wegen der starken Diskriminierung der Hybridform ca_1cu_3 bei Hybridisierung mit den Proben II und III ist es unwahrscheinlich, daß L.curvatus L-LDH Trimere (cu_3), die durch Assoziation mit zugegebenen L.casei L-LDH Monomeren in der Hybridform ca_1cu_3 abgefangen werden sollten, in den Ausgangslösungen vorlagen. Unter der oben aufgeführten Annahme, daß die zum Mischungszeitpunkt vorhandenen cu_2 nicht durch Hybridisierung abgefangen werden können, sind sämtliche Hybridformen auf die Rekombination von L.casei und L.curvatus L-LDH Monomeren zurückzuführen. Die drastische Abnahme von ca_1cu_3 , aber auch von ca_2cu_2 sowie die relative Begünstigung von ca_3cu_1 und die starke Überhöhung des Anteils an ca_4 lassen sich durch den hohen Überschuß an L.casei L-LDH Monomeren über

Tab. 9: Verteilung der verschiedenen L-LDH-Formen nach Hybridisierung einer bei pH 8,8 (15-stündige Dialyse) denaturierten L.casei L-LDH mit unterschiedlich behandelten Proben der L.curvatus L-LDH. Die Summe der nach elektrophoretischer Auftrennung erhaltenen Banden wurde 100 % gesetzt.

Probe I: 15 Stunden dialysiert gegen 15 mM Imidazol pH 7,8 (Kontrolle)

Probe II: 80 Stunden dialysiert gegen 15 mM Imidazol pH 7,4 plus 0,5 mM Mn^{2+}

Probe III: 80 Stunden dialysiert gegen 15 mM Imidazol pH 6,4.

Die Mischung jeweils gleicher Mengen der in einer Konzentration von 0,45 mg/ml vorliegenden Enzyme erfolgte unmittelbar nach Zugabe einer adäquaten Menge an 1 M Acetatpuffer pH 4,8 und Zugabe der Effektoren zur L.casei L-LDH. Die Hybridisierungsansätze enthielten dann 6 mM Mn^{2+} , 1 mM FDP und hatten einen pH-Wert von ca. pH 6,5.

Proben	% Anteil der verschiedenen L-LDH-Formen				
	ca_4	ca_3cu_1	ca_2cu_2	ca_1cu_3	$cu_4 + cu_2$ (bzw. cu_1)
I	16,2	16,6	14,5	19,7	33,0
II	25,6	15,1	6,0	1,0	52,0
III	27,7	12,3	5,6	1,1	53,0

die L.curvatus L-LDH Monomeren schließen. Es ist anzunehmen, daß der geringe Prozentsatz an ca_1cu_3 aus dem Rekombinationsprozeß dieser Monomeren hervorging, zumal die Bildung dieser Form auch wegen der wesentlich höheren Reaktivierungsgeschwindigkeit der L.curvatus L-LDH begünstigt sein sollte.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Sedimentationskonstanten von 3,95 S und 4,6 S als Durchschnittswerte einer Verteilung von Monomeren, Dimeren und Tetrameren aufzufassen sind. Diese Annahme wird durch folgende Überlegung unterstützt. Von der in der Probe I eingesetzten L.curvatus L-LDH, die wohl zu 100 % dissoziiert ist, befinden sich 44 % in den Hybridbanden, von der L.curvatus L-LDH der Proben II und III aber nur 12,6 % bzw. 11,2, also etwa

1/4 davon. Dementsprechend können letztere maximal 25 % des eingesetzten Enzyms im monomeren Zustand enthalten haben. Hätten keine Dimere vorgelegen, müßte der Rest, also mindestens 75 %, nur aus Tetrameren bestehen. Bei einem derartigen Überwiegen der tetrameren Form wären aber Sedimentationskonstanten zu erwarten, die in der Nähe des Wertes der Tetrameren (ca. 7 S) liegen. Die tatsächlich beobachteten relativ niedrigen Werte von 3,95 S und 4,6 S sind also nur so zu verstehen, daß neben den Monomeren und Tetrameren noch ein erheblicher Teil an Dimeren vorlag.

2.8 Hybridisierungsversuch zum Nachweis der aktiven Form der L.casei L-LDH

Viele Beobachtungen, wie z.B. die Inaktivität bei vollständiger Dissoziierung im neutralen (L.curvatus) bis basischen (L.casei) pH-Bereich bzw. durch Harnstoff, die Bildung aktiver Hybrid-tetramerer aus inaktiven Untereinheiten und schließlich die bei beiden Enzymen vorhandene Kooperativität der Substrat- und Effektorbildungsstellen sprechen dafür, daß die Aktivität an den tetrameren Zustand gebunden ist. Ob darüber hinaus auch andere Formen aktiv sind, wurde mit Hilfe folgender Hybridisierungsexperimente untersucht.

Die L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus wurden mit Harnstoff denaturiert (6,6 M Harnstoff; pH 7) und die Reaktivierung der beiden Enzyme durch 9-faches Verdünnen (Imidazolpuffer pH 6,3 plus Mn^{2+} plus FDP) gleichzeitig eingeleitet. Nach verschiedenen Zeiten wurde ein aliquoter Teil der reaktivierenden L.casei L-LDH mit einem 3-fachen Überschuß an reaktivierender L.curvatus L-LDH vermischt. Zur gleichen Zeit wurde jeweils auch die Aktivität der reaktivierenden unvermischten L-LDH-asen gemessen.

Wegen des gleichzeitigen Reaktivierungsbeginns und der ähnlichen Reaktivierungsgeschwindigkeit der beiden L-LDH-asen ($t_{1/2}$ L.casei = 8 min; $t_{1/2}$ L.curvatus = 11 min) ist anzunehmen, daß zu jedem Mischungszeitpunkt in beiden Ansätzen ein vergleichbarer Rena-

turierungsgrad erreicht ist, so daß beim Mischen ein ca. 3-facher Überschuß an L.curvatus L-LDH Monomeren und Dimeren über die entsprechenden L.casei Formen vorliegt. Daher sollten die noch nicht zu Tetrameren assoziierten L.casei Formen durch Hybridbildung mit den im Überschuß zugegebenen L.curvatus L-LDH Formen weitgehend abgefangen werden.

Die nach 6-stündiger Hybridisierung erfolgte elektrophoretische Auftrennung der Gemische ergab, daß nach 21 Minuten Reaktivierung noch alle Hybridbanden auftraten, während nach 60 Minuten keine Hybridbildung mehr stattfand, also nur noch die homomeren Formen vorlagen.

Die durch densitometrische Auswertung der Bandenmuster ermittelte prozentuale Verteilung der L.casei L-LDH auf die Banden ca_4 , ca_3cu_1 , ca_2cu_2 und ca_1cu_3 in Abhängigkeit von der Reaktivierungsdauer sowie der Reaktivierungsverlauf der L.casei L-LDH sind in Abb. 24 dargestellt.

Unter der Voraussetzung eines ca. 3-fachen Überschusses an dissoziiertem L.curvatus Enzym kann man für die ca_4 -Bande sowie für die L.casei L-LDH Anteile an den Hybridbanden ca_3cu_1 , ca_2cu_2 und ca_1cu_3 folgende Herkunft annehmen:

ca_4 besteht zum überwiegenden Teil aus den bis zum Mischungszeitpunkt gebildeten L.casei L-LDH Tetrameren und einem geringfügigen Prozentsatz an Tetrameren, der nachträglich aus nicht quantitativ abgefangenen L.casei L-LDH Monomeren und Dimeren entsteht.

ca_3 enthält die L.casei Anteile der durch Rekombination von noch vorhandenen L.casei L-LDH Monomeren (und Dimeren) mit L.curvatus L-LDH Monomeren entstehenden ca_3cu_1 Hybride sowie die zum Mischungszeitpunkt möglicherweise vorhandenen L.casei Trimeren, die durch Reaktion mit L.curvatus L-LDH Monomeren in die Hybridform ca_3cu_1 eingehen.

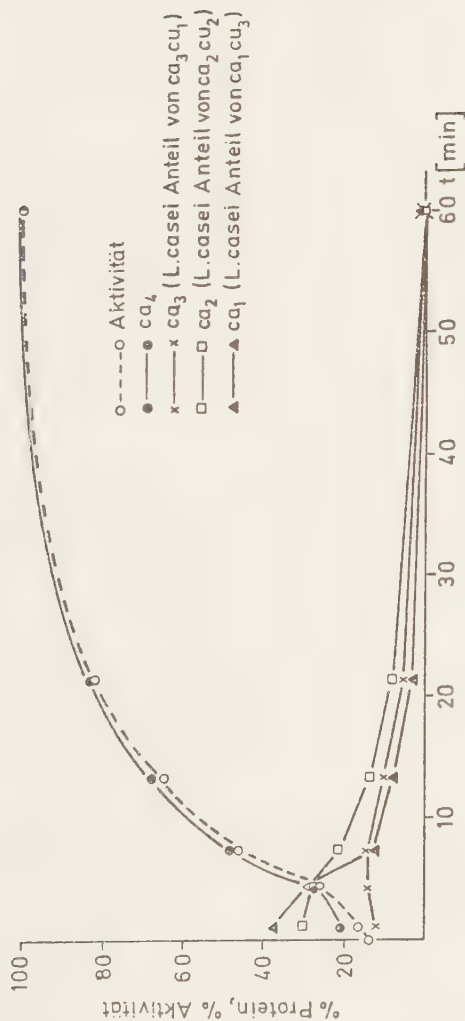


Abb. 24: Verteilung des L-casein Enzyms auf die L-LDH-Formen ca₄, ca₃cu₁, ca₂cu₂ und ca₁cu₃ in Hybridisierungsansätzen mit reaktivierender L-casein- und einem 3-fachen Überschuß an reaktivierender L-curvatus L-LDH, wobei die Mischung nach verschiedenen Zeiten erfolgte (gleichzeitiger Reaktivierungsbeginn). Das in ca₄, ca₃cu₁, ca₂cu₂ und ca₁cu₃ enthaltene L-casein Protein wurde in Prozent des im jeweiligen Hybridisierungsansatz insgesamt enthaltenen L-casein Proteins ausgedrückt. Zu jedem Mischungszeitpunkt wurde die Aktivität des reaktivierenden L-casein Enzyms bestimmt. Die maximale Reaktivierung wurde 100 % gesetzt.
 Denaturierung: 10-minütige Inkubation mit 6,6 M Harnstoff bei pH 7,0
 Reaktivierung: 9-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3 und Zugabe von 6 mM Mn²⁺ und 1 mM FDP.

ca_2 setzt sich zusammen aus dem L.casei L-LDH Anteil, der durch Reaktion der zum Mischungszeitpunkt vorhandenen L.casei L-LDH Dimeren mit L.curvatus L-LDH Dimeren entstehenden ca_2cu_2 Hybride und dem Anteil, der aus der Rekombination von L.casei L-LDH Monomeren und L.curvatus L-LDH Monomeren hervorgehenden ca_2cu_2 Hybride.

ca_1 schließlich repräsentiert einen Teil der zum Mischungszeitpunkt vorhandenen L.casei L-LDH Monomeren, während sich der Rest auf die übrigen Banden verteilt.

Bei einer idealen Rekombination von L.casei L-LDH Monomeren mit einem 3-fachen Überschuß an L.curvatus L-LDH Monomeren sollte sich eine Verteilung der L.casei L-LDH von:

$ca_4 : ca_3 : ca_2 : ca_1 = 1,6 \% : 14,5 \% : 41 \% : 43 \%$ und hieraus abgeleitet ein Verhältnis von $ca_3 : ca_2 : ca_1 = 0,33 : 0,95 : 1$ ergeben. Dieses Verhältnis wird beim 1. Mischungszeitpunkt fast erreicht ($ca_3 : ca_2 : ca_1 = 0,33 : 0,82 : 1$). Unter der bereits erwähnten Annahme, daß während der Reaktivierung der beiden L-LDH-asen ein ca. 3-facher Überschuß an L.curvatus L-LDH Monomeren über die L.casei L-LDH Monomeren erhalten bleibt, sollte auch bei den weiteren Mischungszeitpunkten ein ähnliches Verhältnis erreicht werden. Wie aus der Tab. 10 jedoch hervorgeht, ergibt sich eine umso deutlichere Begünstigung von ca_2 und ca_3 gegenüber ca_1 , je später die Mischung erfolgt. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß spätestens nach dem 3. Mischungszeitpunkt, d.h. nach einer Reaktivierungszeit von ca. 7 Minuten, intermediär L.casei Dimere möglicherweise auch Trimere vorhanden sind, deren Anteile im Verhältnis zur Menge der jeweils vorhandenen Monomeren mit zunehmender Reaktivierungsdauer größer wird. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß die Überhöhung von ca_3 teilweise auf eine Hybridbildung der zum Mischungszeitpunkt vorhandenen ca_2 mit aus Monomeren nachgebildeten ca_1cu_1 Dimeren zurückzuführen ist.

Tab. 10: Verhältnis der in den Hybridbanden ca_3cu_1 , ca_2cu_2 und ca_1cu_3 enthaltenen L.casei L-LDH-Anteile (ca_3 , ca_2 , ca_1) in Hybridisierungsansätzen mit reaktivierendem L.casei- und einem 3-fachen Überschuß an reaktivierendem L.curvatus Enzym. Die Mischung der beiden L-LDH-assen erfolgte nach verschiedenen Zeitintervallen nach (gleichzeitigem) Reaktivierungsbeginn.
 Denaturierung: 10-minütige Inkubation mit 6,6 M Harnstoff bei pH 7,0 (20 mM Imidazol-puffer).
 Renaturierung: 9-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazol-puffer pH 6,3 und Zusatz von 6 mM Mn^{2+} und 1 mM FDP.

Mischungszeitpunkt nach Beginn der Reaktivierung (min)	Verhältnis von:				
	ca ₃	:	ca ₂	:	ca ₁
1	0,33	:	0,82	:	1
4,3	0,48	:	0,96	:	1
7,3	1,1	:	1,7	:	1
13,3	1,2	:	1,7	:	1
21,3	1,6	:	1,9	:	1

Trotz des Vorliegens dieser Intermediärprodukte verläuft, wie aus Abb. 24 zu ersehen ist, die Aktivitätszunahme fast identisch mit der Zunahme der L.casei L-LDH Tetrameren (ca_4). Mit Abschluß der Reaktivierung ist auch keine weitere ca_4 -Zunahme mehr festzustellen. Hieraus kann man schließen, daß die gefundenen Di- und möglicherweise auch Trimeren inaktiv sind, da andernfalls die der Summe der Di-, Tri- und Tetrameren entsprechende Aktivitätszunahme der ca_4 -Zunahme vorausseilen sollte. Tatsächlich liegen aber die jeweils gemessenen Aktivitäten knapp unter den ca_4 -Werten, da erwartungsgemäß der zum Mischungszeitpunkt vorhandene Anteil an ca_4 nachträglich durch nicht quantitativ abgefangene Monomere und Dimere geringfügig erhöht wird. Mit der Annahme inaktiver Di- und Trimerer kann aber auch ausgeschlossen werden, daß bereits die Monomeren aktiv waren. Somit dürfte die Aktivität des L.casei Enzyms, wenigstens unter physiologischer Bedingungen, ausschließlich an den tetrameren Zustand gebunden sein.

3. DISKUSSION

Aus den Molekulargewichtsuntersuchungen geht deutlich hervor, daß auch der Quartärstruktur der beiden aktivierbaren L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* das bei allen bisher untersuchten L-LDH-asen verwirklichte tetramere Bauprinzip zugrunde liegt. Die Molekulargewichte der Untereinheiten, bestimmt durch Gleichgewichtszentrifugation, stimmen mit den durch SDS-Gelelektrophorese erhaltenen Molekulargewichten (Hensel, 1977) gut überein. Aus der Analyse der chemischen Eigenschaften der beiden L-LDH-asen (Hensel, 1977) geht hervor, daß es sich um jeweils identische Untereinheiten handelt.

Einen entsprechenden Aufbau weisen auch die beiden nicht allosterischen L-LDH-asen von *L.acidophilus* und *L.plantarum* auf. Die Molekulargewichte ihrer Untereinheiten (Hensel, 1977) sind fast identisch mit denen der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH, und die bei pH 5,5 bestimmten $s_{20,w}^C$ -Werte entsprechen denen der tetrameren Form des *L.curvatus* und *L.casei* Enzyms. Auch schon von Pesce et al. (1964) war für die *L.plantarum* L-LDH ein entsprechendes Molekulargewicht von 153 000 angegeben worden. Trotz erheblicher Unterschiede der chemischen Eigenschaften zwischen den beiden allosterischen L-LDH-asen einerseits und den nicht allosterischen L-LDH-asen andererseits ist eine Differenzierung aufgrund von Molekulargewichtsbestimmungen nicht möglich. Unabhängig von der Entwicklung besonderer Eigenschaften wie z.B. der Allosterie stellt die Quartärstruktur offenbar ein konstantes Merkmal der L-LDH-asen dar.

3.1 Dissoziationseigenschaften

3.1.1 Einfluß des pH-Wertes

Für L-LDH-asen verschiedener Herkunft wurde eine pH-abhängige Dissoziation beschrieben. So dissoziieren die bisher untersuchten Säuger L-LDH-asen im sauren pH-Bereich. Bei pH 5,0 liegt die Kaninchen M_4 L-LDH beispielsweise in der dimeren Form vor

(Lovell und Winzor, 1974), und die Schwein H_4 bzw. M_4 L-LDH ist bei $pH < 4,0$ bzw. bei $pH < 3,5$ vollkommen in Monomere dissoziiert (Jaenicke, 1974; Rudolph und Jaenicke, 1975). Demgegenüber wurde bei der FDP aktivierbaren L-LDH von *Sc. cremoris* US_3 (Jago et al., 1971; Dynon et al., 1972) und bei der nicht allosterischen L-LDH von *B. subtilis* (Yoshida und Freese, 1965) eine Dissoziation im schwach alkalischen pH-Bereich festgestellt. Beide L-LDH-asen liegen bei pH 9,0 als Dimere vor.

Eine ähnliche pH-Abhängigkeit der Dissoziation zeigen auch die hier untersuchten allosterischen L-LDH-asen von *L. curvatus* und *L. casei*. Bei beiden Enzymen herrscht im schwach sauren pH-Bereich (ca. pH 5,0) der tetramere Zustand vor. Er bleibt bei der *L. casei* L-LDH zumindest bis pH 7,0 erhalten - die Dissoziation in Monomere wurde bei pH 9,2 nachgewiesen - während beim *L. curvatus* Enzym bereits bei pH 6,4 deutliche Dissoziationserscheinungen vorhanden sind und bei pH 7,4 eine vollständige Dissoziation in Monomere erfolgt. Da die isoelektrischen Punkte der *L. curvatus* und *L. casei* L-LDH (Hensel, 1977) mit 4,9 (*L. curvatus*) und 5,3 (*L. casei*) recht nahe beisammen liegen und damit der Gesamtladungszustand jeweils nicht wesentlich verschieden sein dürfte, kann man annehmen, daß zwischen den beiden L-LDH-asen im Interaktionsbereich der Untereinheiten spezifische Unterschiede in der Art oder Anzahl ionisierbarer Gruppen bestehen.

Im Übergangsbereich zwischen dem tetrameren Zustand bei ca. pH 5,0 und der vollkommenen Dissoziation in Monomere bei pH 7,4 liegt die *L. curvatus* L-LDH entsprechend einem Dissoziations-Assoziationsgleichgewicht als Monomer, Dimer und Tetramer, aber vermutlich nicht als Trimer vor. Hierfür sprechen sowohl die Übergangswerte der Sedimentationskonstanten, die im Bereich von pH 5,5 - pH 7,4 zwischen dem den tetrameren Zustand kennzeichnenden $s_{20,w}^C$ -Wert von 6,9 S und dem der monomeren Form zuzuordnenden $s_{20,w}^C$ -Wert von 2,64 S liegen, als auch die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche.

3.1.2 Wirkung der Effektoren

Außer durch den pH-Wert wird die Quartärstruktur der L.curvatus L-LDH durch die Effektoren Mn^{2+} und FDP beeinflusst. Bei pH 7,4 kann FDP alleine die Dissoziation des L.curvatus Enzyms in Monomere ebensowenig verhindern wie bei der L.casei L-LDH bei pH 9,2. Demgegenüber findet bei pH 7,4 in Anwesenheit von Mn^{2+} alleine nur eine teilweise Dissoziation des L.curvatus Enzyms statt, wobei es zur Ausbildung eines Gleichgewichtszustandes zwischen Monomeren, Dimeren und Tetrameren kommt. Die assoziierende Wirkung von Mn^{2+} ist eventuell auf einen Ladungsausgleich im Bereich der schon erwähnten Interaktionsbereiche der Untereinheiten zurückzuführen oder auf eine Konformationsänderung, die mit einer Verlagerung der ionisierbaren Gruppen verbunden ist. Beides könnte zu einer Verminderung der abstoßenden Kräfte zwischen den Untereinheiten führen.

Obwohl FDP alleine bei pH 7,4 praktisch keinen Einfluß auf den Dissoziationsgrad des L.curvatus Enzyms hat, spielt es bei diesem pH-Wert in Verbindung mit Mn^{2+} eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des tetrameren Zustandes der L.curvatus L-LDH. Seine Wirkung dürfte wohl in einer zusätzlichen Änderung der Tertiärstruktur der Untereinheiten zu sehen sein, durch die der assoziierende Effekt von Mn^{2+} günstig beeinflusst wird. Eventuell ist die Erhöhung des $s_{20,w}^c$ -Wertes von 2,64 S auf 2,9 S durch FDP auf eine derartige Änderung der Tertiärstruktur in Richtung einer Verdichtung der Untereinheiten zurückzuführen. Über eine Förderung des tetrameren Zustandes durch FDP wurde schon von Jago et al. (1971) für die FDP aktivierbare L-LDH von Sc.cremoris US₃ berichtet. Für eine nähere Einsicht in die Wirkungsweise der Effektoren ist jedoch die Kenntnis der Bindungsorte und die Anzahl der pro Untereinheit gebundenen Effektermoleküle nötig.

3.1.3 Elektrophoretische Beweglichkeit und Quartärstruktur

Aus dem Ergebnis der Sedimentationsstudien und der Analyse der Hybridisierungsprodukte wird auch die Ursache für die hohe elektrophoretische Beweglichkeit der *L.curvatus* L-LDH im Polyacrylamidgelsystem bei pH 7,5 ohne Zusatz der Effektoren ersichtlich; die Wanderstrecke der *L.curvatus* L-LDH beträgt hier etwa das 1,97-fache der *L.casei* L-LDH. Während das *L.casei* Enzym bei der Gel-Elektrophorese unter diesen pH-Bedingungen im tetrameren Zustand erhalten bleibt, unterliegt die *L.curvatus* L-LDH der Dissoziation. Die von Stetter (1973) bzw. von Kandler und Stetter (1973) für das *L.curvatus* Enzym angegebene Wanderstrecke in diesem Gelsystem kann wohl dem Monomeren vielleicht auch Dimeren zugeordnet werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Sedimentationsversuche können die Effektoren Mn^{2+} und FDP auch hier den tetrameren Zustand weitgehend aufrechterhalten, wie aus der Analyse der bei pH 7,5 in Gegenwart der Effektoren elektrophoretisch aufgetrennten Hybridisierungsprodukte geschlossen werden kann. Außerdem wird durch den Zusatz der Effektoren der Unterschied in der elektrophoretischen Beweglichkeit der beiden Enzyme - die Wanderstrecke des *L.curvatus* Enzyms entspricht nurmehr dem 1,68-fachen desjenigen des *L.casei* Enzyms - vermindert.

3.2 Quartärstruktur und Aktivität

3.2.1 Beziehung zwischen pH- und Effektor-abhängiger Aktivität und tetramerem Zustand

Bei der *L.curvatus* L-LDH ist eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den zur Aufrechterhaltung der Aktivität notwendigen und den die tetramere Struktur stabilisierenden Bedingungen festzustellen. In Abwesenheit der Effektoren sind sowohl der Aktivitätsbereich als auch der Stabilitätsbereich des tetrameren Zustandes auf den schwach sauren pH-Bereich beschränkt. Der Zusatz der beiden Effektoren bewirkt einerseits eine Ver-

breiterung des pH-Optimums bis in den schwach basischen pH-Bereich hinein (Abb. 4 a), andererseits auch die Stabilisierung der tetrameren Quartärstruktur bis pH 7,4. Eine ähnliche Korrelation trifft auch für den Einfluß von Mn^{2+} auf die Aktivität und die Quartärstruktur zu. Auffällig ist auch die Tatsache, daß sigmoide Substrat- (Tab. 4) und Effektorsättigungskurven (Tab. 5) bei pH 6,2 auftreten, in einem pH-Bereich also, in dem die L.curvatus L-LDH bereits in teilweise dissoziiertem Zustand vorliegt.

Zu den hieraus erkennbaren Zusammenhängen zwischen Quartärstruktur- und Aktivitätsveränderung stehen allerdings mehrere Beobachtungen im Widerspruch. Bei der Bestimmung des pH-Optimums der Enzymaktivität in An- und Abwesenheit der Effektoren (Abb. 4 a) wurde die L.curvatus L-LDH ausschließlich im tetrameren Zustand in den Enzymtest eingesetzt (Dialyse bei pH 5,5). Obwohl die tetramere Struktur auch in Abwesenheit der Effektoren zumindest bis pH 5,5 im Testgemisch erhalten bleiben sollte, zeigt das Enzym bei pH 5,5 ohne Effektoren nur noch 30 % der beim pH-Optimum (pH 4,5) meßbaren Aktivität. Desgleichen nimmt die Aktivität beim Wechsel von pH 4,5 zu pH 7,4 trotz Vorliegen der Effektoren um ca. 60 % ab, obwohl die Effektoren bis pH 7,4 eine Dissoziation der Tetrameren verhindern sollten. Ein weiterer Widerspruch ist die im pH-Bereich von pH 5,5 - pH 7,0 wesentlich stärker ausgeprägte aktivierende Wirkung von FDP verglichen mit der von Mn^{2+} , obwohl FDP zumindest bei pH 7,4 keine, oder wenn, dann nur geringfügige Veränderung des pH-induzierten Dissoziationszustandes bewirken kann, während für Mn^{2+} eine deutliche assoziierende Wirkung festgestellt wurde.

Eine Klärung dieser Sachverhalte ergibt sich möglicherweise durch die von verschiedenen Autoren berichtete Verhinderung bzw. Herabsetzung der Dissoziation von L-LDH-asen durch die Anwesenheit von NADH, beispielsweise in verdünnten Lösungen (Cho und Swaisgood, 1973), bei Einwirken von SDS (Di Sabato und Kaplan, 1964) oder unter anderen dissoziierenden Bedingungen (Jago et al., 1971). Dementsprechend könnte man auch im Fall der L.curvatus L-LDH annehmen, daß auch in Abwesenheit

der Effektoren selbst bei höheren pH-Werten durch NADH der tetramere Zustand im Aktivitätstest erhalten bleibt. Für diese Wirkung des Cofaktors spricht, daß nach 70-stündiger Dialyse bei pH 7,0 (15 mM Imidazolpuffer) in Gegenwart von 0,5 mM NADH noch 20 % der Ausgangsaktivität gemessen werden konnte im Gegensatz zu nur 0,5 % bei Abwesenheit des Cofaktors. Die Veränderung der Aktivität der L.curvatus L-LDH beim Übergang vom Sauren ins Neutrale und bei Zugabe der Effektoren dürfte somit im wesentlichen auf Strukturveränderungen innerhalb des tetrameren Zustandes zurückzuführen sein. Eine Dissoziation der in den Aktivitätstest eingesetzten Tetrameren ist möglicherweise erst im Neutralen bis Basischen von Bedeutung.

Wesentlich klarer sind die Verhältnisse im Fall der L.casei L-LDH. Auch in Abwesenheit der Effektoren kann eine Dissoziation der in den Enzymtest eingesetzten L-LDH ausgeschlossen werden. Trotzdem zeigt das Enzym beim Wechsel vom pH-Optimum (ca. pH 4,5) zum Neutralen einen ebenso drastischen Aktivitätsabfall wie die L.curvatus L-LDH. Obwohl die Effektoren Mn^{2+} und FDP für die Aufrechterhaltung des tetrameren Zustandes nicht notwendig sind, wirken sie auch hier aktivitätssteigernd, wobei FDP der wesentlich bessere Aktivator ist. Der positive Einfluß von Mn^{2+} kommt erst im pH-Bereich $> pH\ 5,5$ und nur im Zusammenwirken mit FDP zum Ausdruck und ist bei pH 7,0, ebenso wie beim L.curvatus Enzym, am deutlichsten ausgeprägt.

3.2.2 Rolle der Effektoren für die Aktivität

Die Beeinflussung der Aktivität durch Mn^{2+} und FDP läßt sich durch folgende Wechselwirkung der Effektoren mit den L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei beschreiben. Die pH-abhängige Ladungsänderung bestimmter Gruppen beim Wechsel vom pH-Optimum zum Neutralen, die eine Abstoßung der Untereinheiten bewirkt, führt zwar zu keiner, bzw. im Fall der L.curvatus L-LDH allenfalls bei höheren pH-Werten zu einer teilweisen Dissoziation der in den Aktivitätstest eingesetzten Tetrameren, aber möglicherweise zu einer Auflockerung der Quartärstruktur und damit zum Aktivitätsverlust. Die aktivierende Wirkung des Mn^{2+} könnte somit

durch die Aufrechterhaltung einer komprimierteren Struktur und im Falle der L.curvatus L-LDH bei höheren pH-Werten zusätzlich durch die Beeinflussung des Assoziationszustandes über die Wechselwirkung mit ionisierbaren Gruppen im Interaktionsbereich der Untereinheiten erklärt werden. Demgegenüber dürfte die aktivierende Wirkung von FDP auf einer Konformationsänderung der Monomeren im tetrameren Verband beruhen. Möglicherweise bestehen im Interaktionsbereich nur graduelle Unterschiede zwischen den beiden Enzymen.

3.2.3 Welche aktiven Formen gibt es?

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, daß Aktivität und tetramerer Zustand eng miteinander korreliert sind. Besonders beim L.curvatus Enzym wirken sich alle Bedingungen, die den tetrameren Zustand stören, auch hemmend auf die Aktivität aus. Ein weiterer Hinweis für die Annahme der tetrameren Quartärstruktur als alleinig aktive Form ergibt sich aus der engen Korrelation zwischen der Aktivitätszunahme der L.casei L-LDH im Reaktivierungsprozeß nach Inkubation mit Harnstoff und der Zunahme der Tetrameren. Mit diesem Versuch kann praktisch ausgeschlossen werden, daß assoziierbare Monomere bereits aktiv sind, da andernfalls auch alle oligomeren Zwischenprodukte wie Dimere oder Trimere aktiv sein sollten, was aber offensichtlich nicht der Fall ist. Ob diese Oligomeren kurz vor ihrer Weiterreaktion zum Tetramer, sozusagen in statu nascendi, noch in aktive Zustandsformen übergehen, kann nicht entschieden werden.

Im Gegensatz dazu werden für verschiedene L-LDH-asen auch andere Formen als das Tetramer als aktiv angenommen. So wurde von Cho und Swaisgood (1974) über aktive Monomere der Kaninchen M_4 L-LDH, die kovalent an Glasperlen gebunden waren, berichtet. Auch Tenenbaum-Bayer und Levitzki (1976) schließen bei der Schwein H_4 und M_4 L-LDH auf aktive Formen, die kleiner als das Tetramer sind. Erst kürzlich konnten Eichner und Kaplan (1977) aktive Dimere bei den aus Schwanz- bzw. Beinmuskelgewebe isolierten L-LDH-asen von *Homarus americanus* nachweisen.

3.3 Hybridisierbarkeit und chemische Verwandtschaft

Eine Ähnlichkeit in der Oberflächenstruktur der Kontaktflächen zwischen den *L.casei* und *L.curvatus* L-LDH Untereinheiten kommt durch die Hybridisierbarkeit der beiden Enzyme zum Ausdruck. Wie bei den Hybridisierungsexperimenten zwischen den L-LDH-asen verschiedener Vertebraten (Markert, 1963; Salthe et al., 1965; Fondy und Kaplan, 1965) konnten auch im Fall der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH alle 5 zu erwartenden homo- und heteromeren Kombinationen (ca_4 , ca_3cu_1 , ca_2cu_2 , ca_1cu_3 , cu_4) nachgewiesen werden, wobei alle Formen aktiv waren. Die je nach Hybridisierungsmethode mehr oder weniger stark vom binomialen Verhältnis abweichende Verteilung der Hybridisierungsprodukte läßt sich größtenteils durch das Zusammenwirken von unterschiedlichem Dissoziations- und Reaktivierungsgrad sowie ungleichen Reaktivierungsgeschwindigkeiten erklären. Das unter Berücksichtigung dieser Faktoren nahezu ideale Verhältnis der Rekombination nach Harnstoffdenaturierung und Renaturierung durch Verdünnen ist ein Hinweis dafür, daß bei diesen Bedingungen die Affinität zwischen gleichen und verschiedenen Untereinheiten sehr ähnlich ist.

Da innerhalb der Vertebraten die L-LDH-asen von systematisch weit getrennten Einheiten hybridisiert werden können (Salthe et al., 1965), müssen gewisse strukturelle Gegebenheiten, die für die Interaktion der Untereinheiten wichtig sind, bemerkenswert gut konserviert worden sein. Die weitgehende Homologie der Primärstruktur der Schwein H_4 und M_4 L-LDH (Kiltz et al., 1977) einerseits und der Dornhai M_4 L-LDH (Taylor et al., 1973; 1975; Taylor, 1977) andererseits scheint dies zu bestätigen. Unter diesem Aspekt mag die Nicht-Hybridisierbarkeit der *L.curvatus* L-LDH mit der nicht allosterischen L-LDH von *L.acidophilus* sowie der *L.casei* L-LDH mit der ebenfalls nicht allosterischen L-LDH von *L.plantarum* ein Hinweis dafür sein, daß die Interaktionsbereiche der Untereinheiten der allosterischen und der nicht allosterischen Enzyme größere Unterschiede aufweisen als die entsprechenden Bereiche bei L-LDH-asen tierischer Herkunft.

Für eine größere Ähnlichkeit innerhalb der beiden Paare als zwischen diesen spricht auch die paarweise Übereinstimmung in der N- und C-terminalen Aminosäure sowie charakteristische Unterschiede im Anteil einzelner Aminosäuren innerhalb der Gesamtaminosäurezusammensetzung (Hensel, 1977). Die aus immunologischen Studien an den beiden allosterischen L-LDH-asen erkennbaren weitgehenden Gemeinsamkeiten der Oberflächenstruktur sowohl im monomeren als auch im tetrameren Zustand scheinen auch für die Interaktionsbereiche der Untereinheiten der beiden Enzyme zuzutreffen. Aus dieser engen strukturellen Verwandtschaft zwischen der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH und ihrer Ähnlichkeit in vielen enzymatischen Eigenschaften darf man wohl auf eine gemeinsame Entwicklungsrichtung dieser Enzyme schließen.

3.4 Reaktivierung

3.4.1 Einfluß der Denaturierungsmethode

Die Reaktivierbarkeit der 4 untersuchten L-LDH-asen nach verschiedenen Arten der Denaturierung sowie die Bildung aktiver Hybridformen zwischen der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH zeigt die wenn auch graduell unterschiedliche Reversibilität der Dissoziation aktiver Tetramerer in inaktive Monomere. Die mildeste Denaturierungsmethode scheint die pH-Denaturierung zu sein. Hierfür sprechen sowohl die praktisch vollständige Reaktivierbarkeit des *L.curvatus* Enzyms nach Dissoziation bei pH 7,8 und pH 8,8 als auch die nach pH-Denaturierung gemessenen niedrigen Reaktivierungshalbwertszeiten der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH (Abb. 17), die in der Größenordnung der von Anderson und Weber (1966) für die Rinder H_4 L-LDH ($t_{1/2} = 1,5$ min) und der von Tenenbaum-Bayer und Levitzki (1976) für die Schwein H_4 und M_4 L-LDH ($t_{1/2} = 3,5$ min; $t_{1/2} = 1,1$ min) bestimmten Werte liegen. Im Vergleich zum *L.curvatus* Enzym zeigt die *L.casei* L-LDH eine deutlich geringere Reaktivierbarkeit und eine langsamere Reaktivierung. Die pH-Denaturierung bewirkt hier offensichtlich tiefgreifendere Veränderungen als beim *L.curvatus* Enzym.

Eine bedeutend drastische Denaturierung der Proteine kann bei Inkubation mit Harnstoff angenommen werden. Dies kommt in der, verglichen mit der pH-Denaturierung, wesentlich geringeren Reaktivierbarkeit der L.curvatus L-LDH, den vielfach höheren Reaktivierungshalbwertszeiten des L.curvatus und L.casei Enzyms und den komplizierten Reaktivierungskinetiken zum Ausdruck. Offensichtlich führen die schwach basischen pH-Werte zu keiner so starken Entfaltung der Polypeptidketten, wie dies für Harnstoff bekannt ist.

3.4.2 Gründe für die unvollständige Reaktivierung

Der in verschiedenem Ausmaß auftretende Aktivitätsverlust nach der Reaktivierung ist wahrscheinlich der Bildung höhermolekularer Aggregate zuzuschreiben, da nach der Denaturierung in Harnstoff und anschließenden Reaktivierung durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer häufig eine Trübung der Enzymlösungen festzustellen war. Weitere Möglichkeiten wären eine unvollständige Reassoziatioon und die Bildung inaktiver Tetramerer aus nur teilweise umgefalteten Monomeren. Letzteres scheint allerdings weniger wahrscheinlich, da die elektrophoretische Beweglichkeit der nativen und rekonstituierten Enzyme jeweils identisch war. Außerdem konnten die durch 15-stündige Dialyse gegen pH 7,8 bzw. pH 8,8 denaturierten Enzyme von L.curvatus und L.casei nach ihrer Renaturierung serologisch nicht von den entsprechenden nativen Formen unterschieden werden (Hensel, 1977). Über die Ausbildung inaktiver Aggregate bei der Reaktivierung denaturierter Enzyme wurde auch von anderen Autoren berichtet (Teipel und Koshland, 1971; Rudolph und Jaenicke, 1975).

3.4.3 Kinetik

Dem Reaktivierungsprozeß beider L-LDH-asen liegt nach Inkubation im schwach alkalischen pH-Bereich eine einheitliche Reaktion 1. Ordnung zugrunde. Demgegenüber zeigt die Reaktivierung nach Harnstoffinkubation einen bi- bzw. triphasischen Verlauf. Nach einer lag-Phase, die möglicherweise eine schnelle Umfaltungsreaktion darstellt, verläuft die Reaktivierung der beiden L-LDH-

asen nach einer Kinetik 1. Ordnung, wobei im Falle des L.curvatus Enzyms verschiedene Geschwindigkeitskonstanten beteiligt sein dürften. Dies könnte bedeuten, daß die L.curvatus L-LDH nach der Denaturierung mit Harnstoff in unterschiedlich entfalteten Zuständen vorliegt, so daß der Umfaltungsprozeß zur assoziierbaren Form verschieden lang dauert. Anzeichen für eine Reaktivierungskinetik höherer Ordnung, wie sie für andere L-LDH-asen beschrieben wurden (Rudolph und Jaenicke, 1975; Anderson und Weber, 1966), konnten nicht festgestellt werden. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß niedrigere Enzymkonzentrationen, bei denen die Assoziierung der Untereinheiten geschwindigkeitsbestimmend wird, wegen der Instabilität der L.casei und L.curvatus L-LDH nicht untersucht wurden.

Im Gegensatz zur Kaninchen M_4 (Chilson et al., 1965) und zur Schwein H_4 L-LDH (Teipel und Koshland, 1971), bei denen sowohl die Reaktivierungsrate als auch die Gesamtreaktivierbarkeit durch den Cofaktor NADH erhöht wird, hat dessen Anwesenheit im Reaktivierungsprozeß der L.curvatus und L.casei L-LDH nach Harnstoffdenaturierung nur eine beschleunigende Wirkung, ohne den charakteristischen Reaktivierungsverlauf wesentlich zu verändern. NADH scheint zwar den Umfaltungsprozeß einer der intermediär vorhandenen Formen zu erleichtern, es hat jedoch offenbar keinen Einfluß auf bereits stark denaturiertes bzw. auf das im Renaturierungsprozeß sich inkorrekt faltende Protein. Da der Cofaktor auf das Abweichen der L.curvatus L-LDH vom logarithmischen Reaktivierungsverlauf keinen Einfluß hat, scheint eine Interaktion von NADH mit den für die L.curvatus L-LDH postulierten stärker denaturierten Formen nicht wahrscheinlich.

3.4.4 Mechanismus

Der Renaturierungsverlauf ist bei der L.casei L-LDH durch das Auftreten intermediärer Di- und möglicherweise auch Trimerer und durch eine die Reaktivierungsrate begrenzende Umfaltungsreaktion (Reaktion 1. Ordnung) gekennzeichnet. Eine Umfaltung von inaktiven in aktive Tetramere als geschwindigkeitsbestimmender Schritt - die vorgelagerten Reaktionen sollten hier wesent-

3.5 Schlußbetrachtung

Insgesamt weisen die hier berichteten Ergebnisse auf eine flexible, von zahlreichen Bedingungen (pH; Mn^{2+} ; FDP) beeinflussbare Struktur der L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei* hin. Dies kommt sowohl in der allosterischen Regulation beider Enzyme als auch in der leichten Dissoziierbarkeit der *L.curvatus* L-LDH zum Ausdruck. Ob diese Flexibilität größere Teile der Tertiärstruktur der Untereinheiten umfaßt oder nur auf spezifische Strukturbereiche eines sonst vielleicht mehr starren Moleküls beschränkt ist, bleibt noch zu klären. Wegen der deutlichen Abhängigkeit von verschiedenen Milieufaktoren dürften sich die beiden L-LDH-asen auch für weitere Studien der inter- und intramolekularen Wechselwirkung in oligomeren Systemen als interessante Objekte erweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die NAD-abhängigen, durch FDP und Mn^{2+} aktivierbaren L-LDH-
asen von *Lactobacillus curvatus* (DSM 20010) und *Lactobacillus*
casei (ATCC 393) wurden bis zur Homogenität gereinigt und
ihre katalytischen Eigenschaften sowie ihre Quartärstruktur
vergleichend untersucht.

1. Beide Enzyme katalysieren im wesentlichen die Reduktion
von Pyruvat. Die Affinität zum Lactat als Substrat ist
sehr gering. Eine Ähnlichkeit zwischen den Enzymen besteht
hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Aktivität (pH-Optimum
bei ca. pH 4,5) und der Beeinflussung der Aktivität durch
die Effektoren Mn^{2+} und FDP; sie stabilisieren den aktiven
Zustand bis ins Neutrale. Beide L-LDH-asen zeigen eine
ausgeprägte Kooperativität der Substrat- und Effektor-
bindungsstellen. Mn^{2+} als aktivierender Effektor kann in
beiden Fällen durch verschiedene 2-wertige Metallionen
ersetzt werden.

Unterschiede zwischen den beiden Enzymen bestehen hinsicht-
lich ihrer Stabilität bei Hitzebehandlung und in verdünntem
Zustand sowie hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Mn^{2+} -
Wirkung und verschiedenen kinetischen Eigenschaften.

2. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von L-LDH-asen sowohl
tierischer als auch bakterieller Herkunft weisen auch das
L. curvatus und *L. casei* Enzym einen tetrameren Aufbau auf.
Die durch Gleichgewichtszentrifugation in der analytischen
Ultrazentrifuge bestimmten Molekulargewichte der Tetra-
meren liegen zwischen 140 000 und 150 000. Ihnen können
Sedimentationskonstanten ($s_{20,w}^c$) von ca. 7 S zugeordnet
werden. Für die Monomeren wurden Molekulargewichte von
34 000 - 36 000 und Sedimentationskonstanten von 2,64 S
(*L. curvatus*) bzw. 2,75 S (*L. casei*) gefunden. Bei vergleich-
baren Molekulargewichten der Untereinheiten und $s_{20,w}^c$ -
Werten der nativen Enzyme von 7,2 S und 7,0 S ist auch für
die durch Mn^{2+} und FDP aktivierbaren L-LDH-asen von
L. acidophilus (DSM 20243) und *L. plantarum* (ATCC 14917) ein
tetramerer Aufbau anzunehmen.

3. Die L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* zeigen ein pH-abhängiges Dissoziationsverhalten, wobei bei pH 5,0 der tetramere Zustand vorherrscht. Die vollständige Dissoziation in inaktive Monomere wurde für die *L.curvatus* L-LDH bei pH 7,4, für die *L.casei* L-LDH bei pH 9,2 nachgewiesen. Im Übergangsbereich zwischen pH 5,5 und pH 7,4 liegt die *L.curvatus* L-LDH in einem Dissoziations-Assoziationsgleichgewicht vor, an dem Monomere, Dimere und Tetramere beteiligt sind, Trimere aber wahrscheinlich ausgeschlossen werden können.
4. Die Anwesenheit von Mn^{2+} und FDP stabilisiert auch bei pH 7,4 den tetrameren Zustand der *L.curvatus* L-LDH. FDP, das bei alleiniger Zugabe keinen Einfluß auf den Dissoziationszustand des Enzyms hat, verstärkt die assoziierende Wirkung des Mn^{2+} .
5. Als aktive Form der *L.casei* L-LDH und höchstwahrscheinlich auch der *L.curvatus* L-LDH ist alleine die tetramere Quartärstruktur anzusehen.
6. Die Reversibilität der Dissoziation des *L.curvatus* und *L.casei* Enzyms in Monomere konnte durch Reaktivierungs- und Hybridisierungsversuche nachgewiesen werden. Nach Dissoziation der beiden Enzyme im Alkalischen bzw. mit Harnstoff und anschließender gemeinsamer Rekonstitution wurden nach elektrophoretischer Auftrennung alle 5 zu erwartenden Rekombinanten (ca_4 , ca_3cu_1 , ca_2cu_2 , ca_1cu_3 , cu_4) sowohl in Aktivitäts- als auch Proteinfärbung gefunden. Das Mengenverhältnis, in dem die Rekombinanten entstehen, wird vom Dissoziations- und Reaktivierungsgrad sowie von der Reaktivierungsgeschwindigkeit der Ausgangsenzyme beeinflusst. Ein nahezu ideales Rekombinationsverhältnis wurde nach Harnstoffdenaturierung und Reaktivierung durch Verdünnen mit Reaktivierungspuffer festgestellt.

7. Reaktivierungskinetiken 1. Ordnung sowie Hybridisierungsversuche weisen darauf hin, daß die Rekonstitution des aktiven Tetramer durch einen geschwindigkeitslimitierenden Umfaltungsprozeß der Monomeren bestimmt wird. NADH erhöht bei beiden Enzymen die Reaktivierungsgeschwindigkeit, ohne aber den Reaktivierungsgrad zu beeinflussen. Dem Cosubstrat scheint eine wichtige Rolle im Faltungsprozeß zuzukommen. Der Reassoziierungsweg der L.casei L-LDH von den Monomeren bis zur tetrameren Form ist durch das Auftreten von Di- und Trimeren gekennzeichnet. Ob die Trimeren Ausdruck für einen Reassoziierungsweg über Dimere und Trimere sind oder ob sie nur als instabile Intermediärform bei einer im wesentlichen über eine Dimerisierung der Dimeren verlaufenden Reaktionsfolge auftreten, kann nicht entschieden werden.
8. Hybridisierungsversuche zwischen allosterischen (L.curvatus, L.casei) und nicht allosterischen (L.acidophilus, L.plantarum) L-LDH-asen verliefen negativ. Dies kann als Hinweis für Strukturunterschiede im Interaktionsbereich der Untereinheiten zwischen den getesteten aktivierbaren und nicht aktivierbaren Enzymen gewertet werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien mit Ausnahme von Natriumdodecylsulfat (reinst), N, N'-Methylenbisacrylamid (reinst), Coomassie Brilliantblau (rein), Amidoschwarz (reinst) und Acrylamid (reinst) waren von p. A. Qualität. Acrylamid wurde vor Gebrauch einmal in Aceton umkristallisiert.

Herkunft der Reagenzien:

Fructose-1,6-diphosphat	Boehringer, Mannheim
L-LDH (Kaninchen Iso-I)	
Na-Pyruvat	
NADH	
NAD	
NADPH	
Lithiumlactat	Sigma, München
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Amidoschwarz	
Coomassie Brilliantblau	
DEAE-Zellulose Typ 23 SH	
5,5 Diäthylbarbitursäure	
DNase	
Natriumdodecylsulfat	
N,N'-Methylenbisacrylamid	
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin	
Rinderserumalbumin	
2,4,6-Trinitrobenzolsulphonsäure	
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Sepharose 4 B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
α - Ketobutyrat	Fluka, Schweiz
Oxamidsäure	Schuchard, München
Cellulose-Acetat-Elektrophoresefolien	Schleicher und Schüll, Kassel
Alle übrigen Reagenzien stammen von Merck, Darmstadt.	

2. Organismen

Der Typstamm *L.casei* ssp. *casei* (Orla Jensen) Hansen und Lessel DSM 20011 (ATCC 393) und der Stamm *L.curvatus* (Troili-Petersson) Abo Elnaga und Kandler DSM 20010, ebenso wie *L.plantarum* ssp. *plantarum* (Orla Jensen) Bergey et al. DSM 20174 (ATCC 14917) und *L.acidophilus* (Moro) Hansen und Mocquot DSM 20243 stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen.

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland,
USA

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen.

3. Anzucht der Organismen

Die Organismen wurden durchwegs in MRS-Medium (De Man et al., 1960) kultiviert. Von *L.curvatus* und *L.casei* wurden Massenkulturen in einem 200 l Fermenter (Giovanola) unter Stickstoff bei 34°C angezogen, wobei die Kulturen durch ein Rührsystem (500 UPM) in Bewegung gehalten wurden. Der pH-Wert von pH 5,5 wurde durch die Zugabe von Ammoniumhydroxid konstant gehalten. Die Wachstumsrate der beiden Organismen sowie die Abhängigkeit des Enzymgehalts und der spezifischen Aktivität der Enzyme von der Wachstumsphase sind in der Abb. 25 dargestellt.

L.plantarum und *L.acidophilus* wurden in Standkulturen bei 34°C bzw. 37°C ohne Belüftung angezogen.

Das Wachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Zu Beginn der stationären Phase wurden die Zellen durch Zugabe von Eis auf 5°C abgekühlt und durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit 0,05 M Imidazolpuffer oder auch Leitungswasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

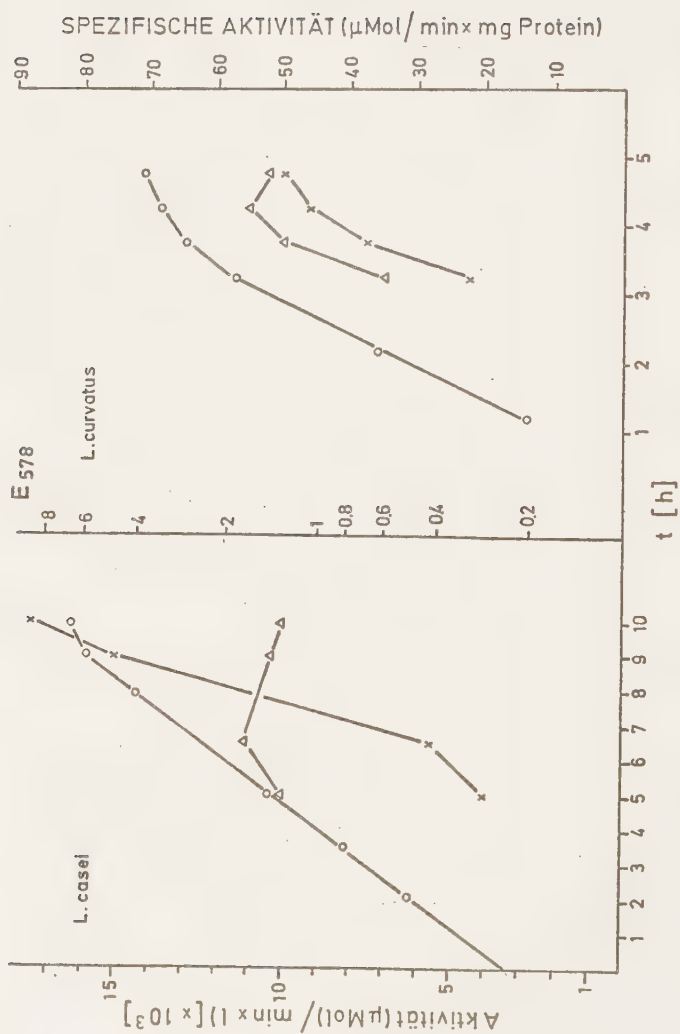


Abb. 25: L-LDH Aktivität von *L. casei* und *L. curvatus* während des Wachstums bei pH 5,5 im Fermenter
 o — o Wachstum (E₅₇₈)
 x — x Gesamtaktivität
 Δ — Δ Spezifische Aktivität

4. Pufferzusammensetzung

Zur Herstellung der verwendeten Acetat-, Imidazol- und Tris-puffer wurde Acetat, Imidazol bzw. Tris in entsprechender Konzentration vorgelegt. Der pH-Wert des Acetattampfers wurde mit Essigsäure, der von Imidazol- bzw. Trispuffer mit HCl eingestellt (Rauen, 1964).

5. Messung der Enzymaktivität

5.1 Verwendete Puffer

Für die Messung der Enzymaktivität wurde der Puffer so gewählt, daß alle 4 Enzyme wenigstens in der Anfangsphase der Reaktion lineare Umsätze zeigten, Metallionen keine störenden Einflüsse hatten und durch Puffer verursachte Hemmeffekte vermieden wurden. Phosphat-, Tris-, Citrat- und Hepespuffer schieden deshalb aus. Im pH-Bereich von pH 4 bis pH 5,6 wurde Acetattampfer und von pH 6,2 bis pH 7,5 Imidazoltampfer verwendet. Letzterer konnte allerdings nur in Konzentrationen unter 0,05 M Imidazol in den Standardtest eingesetzt werden, da er in höheren Konzentrationen die Aktivität der L.casei L-LDH hemmt.

5.2 L-LDH-Aktivität mit Pyruvat als Substrat

Es wurde die Oxydation von NADH photometrisch (Eppendorf-Photometer mit angeschlossenen Kompensationsschreiber) bei 366 nm gemessen. Der Standardtest zum Nachweis der L-LDH-Aktivität enthielt in einem Volumen von 1 ml: 17 mM Pyruvat, 0,65 mM NADH, 80 mM Acetattampfer oder 40 mM Imidazoltampfer und im Fall der L.curvatus und L.casei L-LDH zusätzlich noch 3 mM FDP und 10 mM MnSO_4 . In den Test wurden 0,1 - 0,2 μg Enzymprotein in einem Volumen von 2 μl - 20 μl eingesetzt.

5.3 L-LDH-Aktivität mit Lactat als Substrat

Gemessen wurde die Reduktion von NAD bei 366 nm. Der Testansatz zur Bestimmung der Lactat-Oxydation durch die L-LDH-Asen von L.curvatus und L.casei enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 40 mM Imidazoltampfer pH 7,0, 3,9 mM NAD, 3 mM FDP und 6 mM MnSO_4 ; die Konzentration an Lactat war variabel. Die in den Test eingesetzten Enzymmengen entsprachen obigen Angaben.

6. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Enzymlösungen wurde nach einer Mikromethode von Heil und Zillig (1969) bestimmt. 1-10 µg Protein in einem Volumen von 2-6 µl wurden auf Cellulose-Acetat-Elektrophoresefolien aufgetragen. Nachdem die Auftragungsstellen trocken waren, wurde die Folie in einer Lösung von Amidoschwarz (Zusammensetzung: 0,25 g Amidoschwarz, 45 ml Methanol, 45 ml H₂O, 10 ml Eisessig) 10 Minuten gefärbt und anschließend in demselben Gemisch ohne Amidoschwarz entfärbt. Aus der getrockneten Folie wurden die mit Protein markierten Stellen ausgestanzt, in 0,5 ml eines Gemisches folgender Zusammensetzung: 80 ml Ameisensäure, 10 ml Eisessig und 1 g TCA aufgelöst und hiervon die Extinktion bei 623 nm gemessen. Die Einstellung des Nullwertes erfolgte mit einer aus der gleichen Folie ausgestanzten Leerprobe. Als Referenz wurde bei jedem Test eine definierte Menge an Rinderserumalbumin (4 µg) mitaufgetragen.

7. Präparation der Oxamat-Sepharose

Sepharose 4 B wurde durch Behandlung mit Bromcyan aktiviert und anschließend nach der Methode von Cuatrecasas (1970) mit Hexamethylendiamin substituiert. Die terminale Aminogruppe wurde entsprechend der Methode von O'Carra und Barry (1972), jedoch in Modifikation nach Spielmann et al. (1973) über eine Amidbindung mit Oxalat (Kaliumoxalat) gekoppelt. Nach 24-stündigem Rühren der Reaktionsmischung wurde die substituierte Sepharose gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Der negativ ausfallende Trinitrobenzol-Sulphonat-Test (Cuatrecasas, 1970) zeigte an, daß die Aminogruppen vollkommen reagiert hatten. Die Lagerung der Oxamat-Sepharose erfolgte bei 4°C.

8. Enzymreinigung

8.1 L-LDH von L.casei und L.curvatus

8.1.1 Präparation des Rohextraktes

Die Zellen (100 g) von L.curvatus und L.casei wurden in 50 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5, der im Fall der L.curvatus LDH zusätzlich noch 4 mM MnSO₄ und 1 mM FDP enthielt, suspendiert. Nach Zugabe von 1 mg DNase wurden die Zellen je dreimal nacheinander in der French-Press (Aminco) bei 1400 atm aufgeschlossen. Anschließend wurde 40 Minuten bei 48 000 g zentrifugiert (4°C).

8.1.2 Hitzebehandlung

Nachdem der Rohextrakt mit 40 mM MnSO_4 (L.curvatus) bzw. 100 mM MnSO_4 (L.casei) versetzt worden war, wurde er für 4 min (L.curvatus) bzw. 8 min (L.casei) erhitzt, indem er durch einen sich im Wasserbad (60°C) befindlichen Schlauch gepumpt wurde. Ausgefallenes Protein wurde bei 48 000 g abzentrifugiert.

8.1.3 DEAE-Zellulose-Säulen

Die zur Reinigung der L.casei L-LDH verwendeten DEAE-Zellulose-Säulen (3,2 cm x 15 cm bzw. 2 cm x 4 cm) waren mit 10 mM Imidazolpuffer pH 6,5, der 0,1 mM FDP enthielt, oder mit 10 mM Acetatpuffer pH 5,5, der ebenfalls 0,1 mM FDP enthielt, vor-equilibriert. Die Elution des Proteins erfolgte über einen linearen Gradienten von 0,02 M - 0,3 M NaCl unter Verwendung der oben genannten Puffersysteme. Das L.casei Enzym wurde bei 0,1 M NaCl (pH 6,5) bzw. 0,07 M NaCl (pH 5,5) von der Säule freigesetzt.

8.1.4 Affinitätschromatographie

Der hitzebehandelte Extrakt von L.curvatus bzw. das von der DEAE-Zellulose-Säule eluierte L.casei Enzym wurde in einer Proteinmenge von 100-200 mg auf die Oxamat-Sepharose-Säule (3,2 cm x 15 cm) aufgetragen. Die Säule war mit 0,01 M Acetatpuffer pH 5,5, der 1 mM NADH, 0,2 mM FDP, 4 mM MnSO_4 und 0,2 M NaCl (L.curvatus) bzw. 0,13 M NaCl (L.casei) enthielt, vor-equilibriert.

Nach Auftragen der Enzymlösung wurde die Säule mit 400-500 ml des obigen Puffers gespült und anschließend das Enzym mit demselben Puffer aber ohne NADH eluiert. Eine weitere Reinigung der beiden Enzyme konnte durch eine nochmalige Affinitätschromatographie erreicht werden, wenn die NaCl-Konzentration auf 0,29 M NaCl (L.curvatus) bzw. 0,16 M NaCl (L.casei) erhöht wurde.

8.2 L-LDH von L.plantarum und L.acidophilus

Die beiden Enzyme wurden nach der von Hensel (1977) beschriebenen Methode gereinigt.

9. Vorbehandlung der Enzyme zur Untersuchung ihrer kinetischen Eigenschaften

Zur Entfernung der Effektoren Mn^{2+} und FDP wurden die L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei mindestens 72 Stunden gegen 10 mM Acetatpuffer pH 5,5 bei 4°C dialysiert, wobei der Dialysepuffer etwa dreimal gewechselt wurde.

10. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Es wurden verschiedene Polyacrylamid-Gel-Systeme verwendet. Alle Elektrophoresen wurden bei 4°C durchgeführt. Die Anfärbung des Proteins erfolgte allgemein nach der von Weber und Osborn (1969) beschriebenen Methode.

10.1 Gel-Elektrophorese bei pH 7,5

Da die L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei in Trispuffer instabil sind, wurde das Gel-System Nr. 6 von Maurer (1968) in der von Stetter (1973) modifizierten Form (Glycyl-Glycin-Puffer anstelle von Trispuffer) verwendet. In den meisten Fällen wurden die Gele in 10,5 cm langen Glasröhrchen ($\phi = 0,6$ cm) polymerisiert. Nur in wenigen Ausnahmen wurden 6,5 cm lange Röhrchen verwendet. Auf ein Sammelgel wurde verzichtet, da maximal 30 μ l Enzymlösung mit etwa 2 μ g-10 μ g Protein pro Röhrchen aufgetragen wurde. Die Elektrophorese wurde bei 150 V und 0,7-0,9 mA/Röhrchen (10,5 cm lang) durchgeführt und dauerte etwa 4 Stunden, bis das zur Markierung der Front dienende Bromphenolblau (0,01 %) das Gel passiert hatte. Bei Verwendung von 6,5 cm langen Röhrchen betrug die Spannung 180-270 V und die Stromstärke 1,5 mA/Röhrchen; die Elektrophorese dauerte ca. 90 Minuten. Um die enzymatisch aktiven Banden im Gel lokalisieren zu können, wurde das Gel in einer der beiden folgenden Reaktionslösungen inkubiert:

Reaktion: Lactat $\longrightarrow$ Pyruvat (modifiziert nach Markert und Moller, 1954)

10 ml der Reaktionsmischung enthielten: 0,1 M Trispuffer pH 8,6; 15 mg NAD; 15 mg Lactat; 10 mg Nitroblau-Tetrazolium; 1,5 mg Phenanzinmethosulfat; 3,75 mg FDP; 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Nachdem die das Enzym enthaltende Zone sich violett gefärbt hatte, wurde das Gel gewaschen und in Leitungswasser aufbewahrt.

Reaktion: Pyruvat $\longrightarrow$ Lactat

Mischung a): 0,1 M Imidazolpuffer pH 7,5; 50 mg Pyruvat; 25 mg NADH; 3,75 mg FDP; 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Gesamtvolumen 10 ml.

Mischung b): 0,1 M Trispuffer pH 8,6; 18 mg Nitroblau-Tetrazolium; 3 mg Phenanzinmethosulfat; Gesamtvolumen 10 ml.

Während der Inkubation des Gels in der Mischung a) beginnt sich der mit Enzymprotein besetzte Bereich unter UV-Licht (350 nm) als dunkle Bande von dem fluoreszierenden Gel abzuheben. Sobald diese Banden sichtbar waren, wurde das Gel kurz mit dest. Wasser gewaschen und in die Mischung b) übertragen. Nach ca. 1 Minute färbt sich das Gel blau, während die Enzymbanden ungefärbt bleiben. Nachdem die Färbung optimal war, wurde das Gel gründlich gewaschen und in Leitungswasser aufbewahrt.

10.2 Gel-Elektrophorese bei pH 7,5 in Gegenwart von Mn^{2+} und FDP

Das oben beschriebene Gelsystem wurde zusätzlich durch die Zugabe von 0,1 mM FDP und 1 mM MnSO_4 modifiziert. Die gleiche Konzentration an Mn^{2+} und FDP enthielt auch der Kammerpuffer. Während der Elektrophorese, die bei ca. 140 V und 1,4-1,8 mA/Röhrchen (Länge: 10,5 cm; ϕ 0,6 cm) durchgeführt wurde (4 Stunden), wurde der Kammerpuffer zwei- bis dreimal gewechselt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Hybridgemischen wurde zur Lokalisierung der enzymatisch aktiven Banden das Gel in folgender Lösung inkubiert: 0,1 M Trispuffer pH 8,6; 3,75 mg FDP; 2 mg $\text{Mn}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 25 mg NADH; Gesamtvolumen 10 ml.

Pyruvat wurde in geringsten Mengen solange zugesetzt bis die enzymatisch aktiven Banden unter UV-Licht sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel sofort gewaschen und in die zuvor beschriebene Mischung b) übertragen. Die Weiterbehandlung der Gele erfolgte wie oben beschrieben.

10.3 Harnstoff-Gel-Elektrophorese bei pH 8,7

Die Herstellung der Polyacrylamid-Harnstoff-Gele (7,5 % Acrylamid, 8 M Harnstoff), des Kammerpuffers und des Probenpuffers erfolgte nach der Methode von Jovin et al. (1964). Ein Sammelgel wurde nicht verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 150 V und ca. 3,6 mA/Röhrchen (Länge: 10,5 cm; ϕ 0,6 cm) durchgeführt (3 Stunden).

10.4 Gel-Elektrophorese bei pH 8,7 ohne Harnstoff

Es wurde das von Jovin et al., (1964) beschriebene System verwendet, wobei jedoch weder die Gele noch der Probenpuffer Harnstoff enthielten. Auch hier wurde kein Sammelgel aufpolymerisiert. Die Elektrophorese dauerte etwa 3 Stunden bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von ca. 3,5 mA/Röhrchen (Länge: 10,5 cm; ϕ 0,6 cm).

10.5 SDS-Gel-Elektrophorese

Polyacrylamid-SDS-Gele wurden in Plattenform (12 cm x 11,5 cm x 0,15 cm) in einer von der Firma Hölzl dafür hergestellten Apparatur gegossen. Ein exponentieller Acrylamidgradient von 5 % - 25 % Acrylamid wurde nach der Methode von Mirault und Scherrer (1971) hergestellt. Die Probenkammern wurden durch Einpolymerisieren einer Schablone in das Obergel ausgespart. Die Vorbehandlung der Proben sowie die Herstellung des Kammerpuffers und des Obergels erfolgte nach Laemmli (1970). Pro Kammer wurden 0,5 μ g - 5 μ g Protein in einem Volumen von 10 μ l - 20 μ l aufgetragen. Bei einer Spannung von 150 V dauerte die Elektrophorese ca. 12 Stunden.

11. Zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge

Alle Sedimentationsexperimente wurden bei 20°C in der analytischen Ultrazentrifuge entweder vom Typ Beckman Modell E oder vom Typ Spinco Modell E durchgeführt, wobei beide mit einem photoelektrischen Scanner ausgestattet waren. Die Absorption wurde bei 280 nm registriert. Sämtliche Proben wurden 80 Stunden gegen 15 mM Puffer bei 4°C dialysiert, wobei der Dialysepuffer mindestens dreimal gewechselt wurde. Folgende Puffer wurden verwendet: Acetatpuffer im pH-Bereich von pH 5,0 - pH 5,5, Imidazolpuffer von pH 6,4 - pH 7,4 und Trispuffer bei pH-Werten über pH 7,4.

11.1 Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Die Sedimentationsexperimente wurden bei Umdrehungsgeschwindigkeiten zwischen 44 000 UPM und 52 000 UPM durchgeführt. Es wurden ausschließlich Doppelsektorzellen mit Kel-F-Mittelstücken verwendet. Die Proteinkonzentration betrug, wenn nicht anders vermerkt, 0,45 mg/ml. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte nach dem üblichen graphischen Verfahren (Elias, 1969) aus der Gleichung

$$(s_c)_{app} = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log r}{dt}$$

Unter Miteinbeziehung einiger Korrekturfaktoren kann diese apparente Sedimentationskonstante auf Standardbedingungen (20°C, Wasser) umgerechnet werden. Hieraus erhält man (bei der eingesetzten Proteinkonzentration c) die Sedimentationskonstante $s_{20,w}^c$.

11.2 Molekulargewichtsbestimmungen

Die Bestimmung der Molekulargewichte durch Gleichgewichtssedimentation wurde nach Yphantis (1960) durchgeführt, wobei 6-Kanal-Mittelstücke verwendet wurden. In den meisten Fällen wurde die "high speed meniscus depletion" Methode (Yphantis, 1964) angewandt, d.h. die Umdrehungsgeschwindigkeit wurde so gewählt, daß die Proteinkonzentration am Meniscus der Lösung

praktisch null war.. In den Fällen mit niedrigerer Rotorgeschwindigkeit wurde nach Einstellen des Sedimentations-Diffusionsgleichgewichtes (ca. 24 Stunden) eine Gleichgewichtszentrifugation bei höherer Umdrehungszahl (high-speed meniscus depletion) angeschlossen.

Das apparente Molekulargewicht ergibt sich aus der Gleichung

$$M_{app} = \frac{2 RT}{(1-v_g)} \cdot \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log c}{dr^2}$$

R = Allgemeine Gaskonstante ($8,313 \cdot 10^7$ erg grad⁻¹mol⁻¹)

T = Temperatur bei der Versuchsdurchführung in °K

C = Proteinkonzentration

V = Partielles spezifisches Volumen des Gelösten

g = Dichte der Lösung

Durch graphische Extrapolation auf unendliche Verdünnung wird aus dem apparenten Molekulargewicht die konzentrationsunabhängige Molekulargewichtskonstante. Auf eine derartige Umrechnung wurde verzichtet, da die Versuche bei niedrigen Proteinkonzentrationen (0,15 mg/ml - 0,2 mg/ml) durchgeführt wurden.

11.3 Zusatzmessungen

11.3.1 Dichtemessung

Die Dichte wurde mit einer digitalen Präzisionsdichtemeßapparatur, Typ DMA 0,2/ C der Firma Heraeus-Paar nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Durch zwei hintereinandergeschaltete Thermostate der Firma Haake, Berlin, wurde die Temperatur bei 20°C[±] 0,005°C konstant gehalten.

11.3.2 Viskositätsbestimmung

Die Viskositätsbestimmung erfolgte in einem Ubbelohde-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau (Jenaer Glaswerk Schott u.Gen., Mainz) bei 20°C.

11.3.3 Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens

Das partielle spezifische Volumen wurde aus der Aminosäurezusammensetzung (Hensel, 1977) nach Haschenmeyer (1973) bestimmt.

12. Denaturierung der L-LDH-asen

Zur Bestimmung der optimalen Denaturierungsbedingungen wurden die Enzyme bei einer Reihe unterschiedlicher experimenteller Bedingungen getestet, wobei der Einfluß von Harnstoff, des pH-Wertes und der Temperatur untersucht wurde. Hieraus ergaben sich folgende Methoden zur Denaturierung der 4 L-LDH-asen.

12.1 Denaturierung mit Harnstoff

Die *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH (0,2 mg/ml - 0,8 mg/ml) wurden ca. 15 Minuten bei pH 7,0 (20 mM Imidazolpuffer) in 6,6 M Harnstoff inkubiert. Für die L-LDH-asen von *L.plantarum* (0,2 mg/ml) und *L.acidophilus* (0,2 mg/ml) erwiesen sich folgende Bedingungen als optimal: pH 8,5 (20 mM Trispuffer), 6,6 M Harnstoff, 50 Minuten Inkubation bzw. pH 8,5 (20 mM Trispuffer), 8 M Harnstoff, 50 Minuten Inkubation.

Nach Anwendung dieser Methoden zeigten die *L.curvatus* und *L.acidophilus* L-LDH keine Aktivität mehr, während die *L.plantarum* und *L.casei* L-LDH noch ca. 10 % bzw. 5 % - 10 % Restaktivität aufwiesen. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

12.2 Denaturierung durch Inkubation im Alkalischen

Die L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* wurden in einer Konzentration von 0,45 mg/ml 15 Stunden bei 4°C gegen 15 mM Imidazolpuffer pH 7,8 (nur *L.curvatus*) bzw. 15 mM Imidazol pH 8,8 (der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH eingestellt) dialysiert, oder die Enzyme wurden mit den entsprechenden Puffern 10-fach verdünnt - die Proteinkonzentration betrug dann 0,1 mg/ml - und 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Dies bewirkte bei der *L.curvatus* L-LDH einen vollständigen Aktivitätsverlust, während die *L.casei* L-LDH noch 10-15 % ihrer Ausgangsaktivität aufwies.

13. Reaktivierung der L-LDH-asen

Die Reaktivierung nach Inkubation mit Harnstoff erfolgte entweder durch 40-stündige Dialyse bei 4°C gegen Reaktivierungspuffer (10 mM Imidazolpuffer pH 6,5, 6 mM MnSO_4 ; 1 mM FDP), wobei der Puffer mehrmals gewechselt wurde oder durch 9-faches Verdünnen der Inkubationsmischung mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3, der 6,75 mM MnSO_4 und 1,12 mM FDP enthielt (Raumtemperatur).

Die Reaktivierung nach Inkubation im Basischen wurde erreicht durch einen schnellen Wechsel auf Reaktivierungsbedingungen (ca. pH 6,5; MnSO_4 ; FDP; Raumtemperatur):

- a) Zu der Enzymlösung wurde eine entsprechende Menge an 1 M Acetatpuffer pH 4,8, der MnSO_4 und FDP enthielt, gegeben, so daß im Reaktivierungsgemisch 6 mM MnSO_4 und 1 mM FDP vorlag.
- b) Die Enzymlösung wurde mit 80 mM Imidazolpuffer pH 6,3 (plus MnSO_4 plus FDP) 2,5-fach verdünnt. Die Konzentration von MnSO_4 und FDP im Reaktivierungsgemisch betrug wiederum 6 mM bzw. 1 mM.

Im Fall der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH wurde der Reaktivierungsprozeß durch Bestimmung der Aktivität nach verschiedenen Zeiten verfolgt, wobei ein aliquoter Teil des reaktivierenden Enzyms in den Standardtest eingesetzt wurde. Der Nullpunkt wurde durch direktes Einsetzen des denaturierten Enzyms in den Standardtest erhalten.

14. Hybridisierung

Bei routinemäßigen Hybridisierungsversuchen zwischen den 4 L-LDH-asen wurden die Enzyme, wie oben beschrieben, getrennt in Harnstoff denaturiert, dann gleiche Mengen zweier L-LDH-asen vereinigt und die Enzymmischung durch Dialyse gegen Reaktivierungspuffer reaktiviert.

Bei Hybridisierungsversuchen zwischen der *L.curvatus* und *L.casei* L-LDH wurden folgende Alternativmethoden angewandt:

- a) Nach getrennter Denaturierung der beiden Enzyme in Harnstoff wurden gleiche Enzymmengen vereinigt und das Gemisch durch 9-faches Verdünnen mit 20 mM Imidazolpuffer pH 6,3, der 6,75 mM MnSO_4 und 1,12 mM FDP enthielt, reaktiviert.
- b) Nach getrennter Denaturierung im Basischen wurde die *L.casei* L-LDH durch Zugabe einer entsprechenden Menge an 1 M Acetatpuffer pH 4,8, der MnSO_4 und FDP enthielt, auf Reaktivierungsbedingungen umgestellt und die *L.curvatus* L-LDH unmittelbar hinzugefügt. Die Reaktivierungsmischung enthielt dann insgesamt 6 mM MnSO_4 und 1 mM FDP und hatte einen pH-Wert von ca. 6,5.

Die reaktivierten Enzymgemische wurden durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese analysiert. Zur quantitativen Bestimmung der Proteinbanden der Elektropherogramme wurde ein Vitatron Densitometer (585 nm) verwendet, wobei die Proteinmenge proportional der Fläche unter der Absorptionskurve war.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M.J., Ford, G.C., Koekoek, R., Lentz, P.J., Mc Pherson, A.,
Rossmann, M.G., Smiley, I.E., Schewitz, R.W., Wonacott, A.J.:
Structure of lactate dehydrogenase at 2,8 Å resolution.
Nature 227, 1098-1103 (1970).
- Adams, M.J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G.C.,
Hackert, M.L., Liljas, A., Rossmann, M.G., Smiley, I.E.,
Allison, W.S., Everse, J., Kaplan, N.O., Taylor, S.S.:
Structure-function relationships in lactate dehydrogenase.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 1968-1972 (1973).
- Anderson, S., Weber, G.: The reversible acid dissociation
and hybridization of lactic dehydrogenase.
Arch.Biochem.Biophys. 116, 207-223 (1966).
- Appella, E., Markert, C.L.: Dissociation of lactate
dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 6, 171-176 (1961).
- Bartholmes, P., Durchschlag, H., Jaenicke, R.: Molecular
properties of lactic dehydrogenase under the conditions
of the enzymatic test.
Eur.J.Biochem. 39, 101-108 (1973).
- Brown, A.T., Wittenberger, C.L.: Fructose-1,6-diphosphate-
dependent lactate dehydrogenase from a cariogenic strepto-
coccus: Purification and regulatory properties.
J.Bact. 110, 604-615 (1972).
- Brown, A.T., Christian, C.P., Eifert, R.L.: Purification,
characterization and regulation of a NAD-dependent lactate
dehydrogenase from Actinomyces viscosus.
J.Bact. 122, 1126-1135 (1975).

Burke, W.F., Gracy, R.W., Harris, B.G.: Studies on enzymes from parasitic helminths. III Purification and properties of lactate dehydrogenase from the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*.

Comp.Biochem.Physiol. 43 B, 345-359 (1972).

Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L., Zwilling, E.: Nature and development of lactic dehydrogenase. The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in make up during evolution.

Science 136, 962-969 (1962).

Chilson, O.P., Costello, L.A., Kaplan, N.O.: Hybridization of lactic dehydrogenase in vitro by concentrated sodium chloride and by reversible inactivation in urea.

J.Mol.Biol. 10, 349-352 (1964).

Chilson, O.P., Costello, L.A., Kaplan, N.O.: Studies on the mechanism of hybridization of lactic dehydrogenase in vitro.

Biochemistry 4, 271-281 (1965).

Chilson, O.P., Kitto, G.B., Kaplan, N.O.: Factors affecting the reversible dissociation of dehydrogenases.

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 53, 1006-1013 (1965).

Chilson, O.P., Kitto, G.B., Pudles, J., Kaplan, N.O.:

Reversible inactivation of dehydrogenases.

J.Biol.Chem. 241, 2431-2445 (1966).

Cho, I.C., Swaisgood, H.: Factors affecting tetramer dissociation of rabbit muscle lactate dehydrogenase and reactivity of its sulphydryl groups.

Biochemistry 12, 1572-1577 (1973).

Cho, I.C., Swaisgood, H.: Surface-bound lactate dehydrogenase: preparation and study of the effect of matrix microenvironment on kinetic and structural properties.

Biochim.Biophys.Acta 334, 243-256 (1974).

Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography.

J.Biol.Chem. 245, 3059-3065 (1970).

Dellaglio, F., Bottazzi, V., Vescovo, M.: Deoxyribonucleic acid homology among lactobacillus species of the subgenus Streptobacterium Orla-Jensen.

Int.J.Syst.Bact. 25, 160-172 (1975).

Dennis, D., Kaplan, N.O.: D- and L-lactic acid dehydrogenases in *L.plantarum*.

J.Biol.Chem. 235, 810-818 (1960).

Dynon, M.K., Jago, R.G., Davidson, B.E.: The subunit structure of lactate dehydrogenase from *Streptococcus cremoris* US₃.

Eur.J.Biochem. 30, 348-353 (1972).

Eichner, R.D., Kaplan, N.O.: Physical and chemical properties of lactate dehydrogenase in *Homarus americanus*.

Arch.Biochem.Biophys. 181, 490-500 (1977).

Elias, H.G.: Ultrazentrifugen-Methoden. München: Beckman Instruments GmbH 1969.

Eventhoff, W., Hackert, M.L., Rossmann, M.G.: A low resolution crystallographic study of porcine heart lactate dehydrogenase.

J.Mol.Biol. 98, 249-258 (1975).

Fondy, T.P., Pesce, A., Freedberg, I., Stolzenbach, F., Kaplan, N.O.: The comparative enzymology of lactic dehydrogenases.

II. Properties of the crystalline HM₃ hybrid from chicken muscle and of H₂M₂ hybrid and H₄ enzyme from chicken liver. Biochemistry 3, 522-530 (1964).

Fondy, T.P., Kaplan, N.O.: Structural and functional properties of the H and M subunits of lactic dehydrogenases.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 119, 888-904 (1965).

- Gasser, F., Doudoroff, M., Contopoulos, R.: Purification and properties of NAD-dependent lactic dehydrogenase of different species of *Lactobacillus*.
J.Gen.Microbiol. 62, 241-250 (1970).
- Götz, F., Schleifer, K.H.: Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphateactivated L-lactate dehydrogenase from *Staphylococcus epidermidis*.
Arch.Microbiol. 105, 303-312 (1975).
- Gordon, G.L., Doelle, H.W.: Purification, properties and immunological relationship of L(+)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*.
Eur.J.Biochem. 67, 543-555 (1976).
- Haschenmeyer, R.H., Haschenmeyer, A.E.: Proteins, 160-166.
Wiley-Verlag, New York (1973).
- Heil, A., Zillig, W.: Reconstitution of bacterial DNA-dependent-RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription.
FEBS Lett. 11, 165-168 (1969).
- Hensel, R.: Immunologische und chemische Untersuchungen an Laktatdehydrogenasen verschiedener Milchsäurebakterien.
Dissertation, Universität München (1977).
- Holland, R., Pritchard, G.G.: Regulation of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose-1,6-diphosphate and metal ions.
J.Bact. 121, 777-784 (1975).
- Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., Rossmann, M.G.: Lactate dehydrogenase. In *The Enzymes* 11 part A ed. (Boyer, P.D. ed.) Academic Press New York, San Francisco, London, 190-292 (1975).

- Jaenicke, R., Knopf, S.: Molecular weight and quaternary structure of lactic dehydrogenase. 3. Comparative determination by sedimentation analysis, light scattering and osmosis.
Eur.J.Biochem. 4, 157-163 (1968).
- Jaenicke, R.: Reassociation and reactivation of lactic dehydrogenase from the unfolded subunits.
Eur.J.Biochem. 46, 149-155 (1974).
- Jago, G.R., Nichol, L.W., O'Dea, K., Sawyer, W.H.: Physicochemical studies on the lactate dehydrogenase of *Streptococcus cremoris* US₃: the effects of modifiers.
Biochim.Biophys.Acta 250, 271-285 (1971).
- Jonas, H.A., Anders, R.F., Jago, G.R.: Factors affecting the activity of lactate dehydrogenase from *Streptococcus cremoris*.
J.Bact. 111, 397-403 (1972).
- Jovin, T., Chrambach, A., Naughton, M.A.: An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal.Biochem. 9, 351-369 (1964).
- Kaloustian, H.D., Stolzenbach, F.E., Everse, J., Kaplan, N.O.: Lactate dehydrogenase of lobster (*Homarus americanus*) tail muscle. I. Physical and chemical properties.
J.Biol.Chem. 244, 2891-2901 (1969).
- Kandler, O., Stetter, K.O.: Der Beitrag neuerer biochemischer Merkmale für die Systematik der Laktobazillen.
3. Symp. Techn.Mikrobiol., Berlin (1973).
- Kiltz, H.H., Keil, W., Griesbach, M., Petry, K., Meyer, H.: The primary structure of porcine lactate dehydrogenase: isoenzymes M₄ and H₄.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 123-127 (1977).

- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature (Lond.) 227, 680-685 (1970).
- Lé John, H.B.: D(-)-lactate dehydrogenases in fungi. Kinetics and allosteric inhibition by guanosine triphosphate.
J.Biol.Chem. 246, 2116-2126 (1971).
- Lineweaver, H., Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants.
J.Amer.Chem.Soc. 56, 658-666 (1934).
- Long, G.L., Kaplan, N.O.: D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals.
Science 162, 685-686 (1968).
- Lovell, S.J., Winzor, D.J.: Effects of phosphate on the dissociation and enzymic stability of rabbit muscle lactate dehydrogenase.
Biochemistry 13, 3527-3531 (1974).
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli.
J.Appl.Bact. 23, 130-135 (1960).
- Markert, C.L., Moller, F.: Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 45, 753 (1959).
- Markert, C.L.: Lactate dehydrogenase isoenzymes: dissociation and recombination of subunits.
Science 140, 1329-1330 (1963).
- Maurer, H.R.: Disc-electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Berlin: de Gruyter 1968.

- Mirault, M.E., Scherrer, K.: Isolation of preribosomes from Hela cells and their characterisation by electrophoresis on uniform and exponential-gradient-polyacrylamide gels. *Eur.J.Biochem.* 23, 372-386 (1971).
- Mou, L., Mulvena, D.P., Jonas, H.A., Jago, G.R.: Purification and properties of NAD-dependent D- and L-lactate dehydrogenases in a group N Streptococcus. *J.Bact.* 111, 392-396 (1972).
- Neimark, H., Lemcke, R.M.: Occurrence and properties of lactic dehydrogenases of fermentative mycoplasmas. *J.Bact.* 111, 633-640 (1972).
- Neimark, H., Tung, M.C.: Properties of a fructose-1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase from *Acholeplasma laidlawii* type A. *J.Bact.* 114, 1025-1033 (1973).
- O'Carra, P., Barry, S.: Affinity chromatography of lactate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 21, 281-285 (1972).
- Penhoet, E., Kochman, M., Valentine, R., Rutter, W.C.: The subunit structure of mammalian fructose diphosphate aldolase. *Biochemistry* 6, 2940-2949 (1967).
- Pesce, A., Mc Kay, R.H., Stolzenbach, F., Cahn, R.D., Kaplan, N.O.: The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzymes. *J.Biol.Chem.* 239, 1753-1761 (1964).
- Rauen, H.M.: *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Teil, 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

Rossmann, M.G., Adams, M.J., Buehner, M., Ford, G.C., Hackert, M.L., Liljas, A., Rao, S.T., Banaszak, L.J., Hill, E., Tsernoglou, D., Webb, L.: Molecular symmetry axes and subunit interfaces in certain dehydrogenases. *J.Mol.Biol.* 76, 533-537 (1973).

Rudolph, R., Jaenicke, R.: Kinetics of reassociation and reactivation of pig-muscle lactic dehydrogenase after acid dissociation. *Eur.J.Biochem.* 63, 409-417 (1976).

Di Sabato, G., Kaplan, N.O.: The denaturation of lactic dehydrogenases. The effect of sodium dodecylsulfate. *J.Biol.Chem.* 239, 438-443 (1964).

Salthe, S.N., Chilson, O.P., Kaplan, N.O.: Hybridization of lactic dehydrogenase in vivo and in vitro. *Nature* 207, 723-726 (1965).

Schleifer, K.H., Kocur, M.: Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. *Arch.Mikrobiol.* 93, 65-85 (1973).

Spielmann, H., Erickson, R.P., Epstein, C.J.: The separation of lactate dehydrogenase X from other lactate dehydrogenase isoenzymes of mouse tests by affinity chromatography. *FEBS Lett.* 35, 19-23 (1973).

Stellwagen, E., Schachmann, H.K.: The dissociation and reconstitution of aldolase. *Biochemistry* 1, 1056-1069 (1962).

Stetter, K.O.: Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerengemischen bei Laktobazillen.
Dissertation, Technische Universität München (1973).

- Suzuki, K., Hibino, K., Imahori, K.: Hybridization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in borate. *J.Biochem.* 79, 1287-1295 (1976).
- Tarmy, E.M., Kaplan, N.O.: Kinetics of E.coli B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. *J.Biol.Chem.* 243, 2587-2596 (1968).
- Taylor, S.S., Oxley, S.S., Allison, W.S., Kaplan, N.O.: Amino acid sequence of dogfish M₄ lactate dehydrogenase. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 70, 1790-1794 (1973).
- Taylor, S.S., William, S., Kaplan, N.O.: The amino acid sequence of the tryptic peptides isolated from dogfish M₄ lactate dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 250, 8740-8747 (1975).
- Taylor, S.S.: Amino acid sequence of dogfish muscle lactate dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 252, 1799-1806 (1977).
- Teipel, J.W., Koshland, D.E., Jr.: Kinetic aspects of conformational changes in proteins. I. Rate of regain of enzyme activity from denatured proteins. II. Structural changes in renaturation of denatured proteins. *Biochemistry* 10, 792-805 (1971).
- Tenenbaum-Bayer, H., Levitzki, A.: The refolding of lactate dehydrogenase subunits and their assembly to the functional tetramer. *Biochim.Biophys.Acta* 445, 261-279 (1976).
- De Vries, W., Gerbrandy, S.J., Stouthamer, A.H.: Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim.Biophys.Acta (Amst.)* 136, 415-425 (1967).

- De Vries, W., Kapteijn, W.M.C., Van der Beek, E.G.,
Stouthamer, A.H.: Molar growth yields and fermentation
balances of *Lactobacillus casei* L₃ in batch cultures
and in continuous cultures.
J.Gen.Microbiol. 63, 333-345 (1970).
- Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight
determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
electrophoresis.
J.Biol.Chem. 244, 4406-4412 (1969).
- Wittenberger, Ch.L., Fulco, J.G.: Purification and allosteric
properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked
D(-)-specific lactate dehydrogenase from *Butyribacterium*
rettgeri.
J.Biol.Chem. 242, 2917-2924 (1967).
- Wittenberger, Ch.L., Angelo, N.: Purification and properties
of a fructose-1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase
from *Streptococcus faecalis*.
J.Bact. 101, 717-724 (1970).
- Wolin, M.J.: Fructose-1,6-diphosphate requirement of strepto-
coccal lactic dehydrogenases.
Science 146, 775-776 (1964).
- Yoshida, A., Freese, E.: Purification and chemical characteri-
zation of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*.
Biochim.Biophys.Acta 99, 56-65 (1965).
- Yphantis, D.A.: Rapid determination of molecular weights of
peptides and proteins.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 88, 586-601 (1960).
- Yphantis, D.A.: Equilibrium ultracentrifugation of dilute
solutions.
Biochemistry 3, 297-317 (1964).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.O.Kandler von 1974 - 1977 durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof.Dr.O.Kandler für das rege Interesse an meiner Arbeit, die vielseitigen Anregungen und die wertvollen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr.R.Schmid und Herrn Dr. W.Schartau vom Zoologischen Institut der Universität München, Herrn Dr.G.Fink und Frau M.Preußner vom Institut für technische Chemie der Technischen Universität München, Herrn Dr.H.Kolb vom Institut für Diabetis des Schwabinger Krankenhauses und Herrn Prof.Dr.R.Jaenicke sowie Herrn Dr.H.Durchschlag vom Institut für Biochemie II der Universität Regensburg für die hilfreiche Unterstützung bei den Ultrazentrifugationsexperimenten danken.

Bei Herrn Prof.Dr.R.Wagner und Herrn Dipl.Ing.Wania (Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Stöckheim) bedanke ich mich für die Massenzucht von *L.casei* und *L.curvatus*.

Herrn Dr.K.O.Stetter danke ich für das Interesse und für wertvolle Anregungen.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern des **Botanischen** Instituts der Universität München.

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name: Mayr Ulrich
Geburtsdatum: 28.10.1946 in Bad Reichenhall
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

2. Schulbildung:

1953 - 1958 Volksschule Wehr-Öflingen
(Baden-Württemberg)
1958 - 1961 Realgymnasium Säckingen
1961 - 1967 Naturwissenschaftlicher
Zweig des Karlsgymnasiums
Bad Reichenhall

3. Wehrdienst:

1967 - 1969

4. Studium:

1969 - 1974 Biologie/Chemie für das
Lehramt an der Universität
München
Wiss. Prüfung für das
Lehramt an Gymnasien:
Frühjahr 1974

5. Promotion:

1974 - 1977 unter der Anleitung von
Prof.Dr.O.Kandler
Wissenschaftliche Hilfs-
kraft von 1974 - 1976
Verwalter einer wissen-
schaftlichen Assistenten-
stelle von 1976 - 1977

